

Aus dem Institut für Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

Der postnaupliale Keimstreif von *Porcellio scaber* und *Orchestia cavimana* (Crustacea, Peracarida): Zelllinie, Genexpression und Beginn der Morphogenese

zur Erlangung des Dr. rer. nat.

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

von Dipl. Biol. Andreas Hejnol, geb. am 11. 10. 1969 in Bremen

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Ronacher

Gutachter: 1. Prof. Dr. Gerhard Scholtz

2. Prof. Dr. Wolfgang Dohle

3. Prof. Dr. Adriaan Dorresteyn

eingereicht: 04. 02. 2002

Datum der Promotion: 20. 03. 2002

Zusammenfassung

Malakostrake Krebse zeigen im postnauplialen Keimstreif ein invariantes Zellteilungsmuster und eine Zelllinie. Embryonen eines Isopoden (*Porcellio scaber*) und eines Amphipoden (*Orchestia cavimana*) wurden bezüglich ihrer Zelllinie vergleichend untersucht. Mittels immunhistochemischer Färbungen wurde das Expressionsmuster der Gene *engrailed* und *Distal-less* in Hinblick auf die Zelllinie und die Morphogenese der Segmente und der Beinentwicklung analysiert. Die Zelllinie wurde bei *Porcellio scaber* mit der Methode der 4D-Mikroskopie untersucht. Mit Zellablationsexperimenten wurden Abhängigkeiten der Zellen untereinander aufgezeigt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen: I. Die Genexpression von *Distal-less* und *engrailed* wird unabhängig von der Zelllinie reguliert. II. Die Bildung der konvergenten einästigen Beine im Thoraxbereich beider Krebse erfolgt durch unterschiedliche Regulation des Gens *Distal-less* - bei *Orchestia cavimana* wird die Expression des Gens in den lateralen Zellen abgeschaltet, während diese Zellen bei *Porcellio scaber* erst gar nicht *Distal-less* exprimieren. III. Die Anwendung des Systems der 4D-Mikroskopie zeigte unter anderem, dass in den vorderen Reihen nichtektoteloblastischen Ursprungs bei *Porcellio scaber* die Zelllinie variabel ist und eine Zellsortierung und Zellimmigration stattfindet. IV. Die Ähnlichkeit der Bildung dieser Reihen bei *Porcellio scaber* mit der der Tanaidaceen lässt auf ein Schwestergruppenverhältnis der Taxa Isopoda und Tanaidacea schließen.

Zelllinie

Crustacea

Distal-less

engrailed

Zell-Ablation

4D-Mikroskopie

Abstract

Malacostracan crustaceans show in their postnaupliar germ-band an invariant cleavage pattern and a cell-lineage. A comparative analysis of this cell-lineage in an isopod (*Porcellio scaber*) and an amphipod (*Orchestia cavimana*) was done in this thesis. Immunohistochemical stainings of the gene products *Distal-less* and *Engrailed* were used to show the relation of these genes to the morphogenesis of segments and legs. Further, the cell-lineage of *Porcellio scaber* was analyzed with a 4D-microscopy system. Cell-ablation experiments were used to show regulational networks in the development of the germ-band.

The results of this work show: I. The regulation of the genes *Distal-less* and *engrailed* is independent of the cell-lineage. II. The morphogenesis of the convergent monoramous limbs in the thorax is reflected by different expression patterns of the gene *Distal-less* - in *Orchestia cavimana* the expression of *Distal-less* is switched off in the lateral cells, in *Porcellio scaber* these cells do not start the *Distal-less* expression. III. The 4D-microscopy analysis show, that the cell-lineage in the cell rows wich have a non-ectoteloblastic origin is not invariant, in contrast to the cells of the more posterior rows these cells show cell-sorting. IV. The formation of these rows in the isopod *Porcellio scaber* shows similarity to the formation in tanaidaceans. Therefore the results of this work strongly support a sister group relationship of Tanaidacea and Isopoda.

cell-lineage

crustacean

Distal-less

engrailed

cell-ablation

4D-Microscopy

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
2	Material und Methoden	10
2.1	Tierhaltung	10
2.2	Immunhistochemie.....	10
2.3	Rasterelektronenmikroskopie	11
2.4	4D-Mikroskopie.....	12
	Die Präparation der Embryonen für die 4D-Mikroskopie	12
	Analyse der Zelllinien mit Simi°BioCell	13
	Terminologie der Zellen und Bezeichnungen der 4D-Aufnahmen.....	14
2.5	Zellablationsexperimente an <i>Porcellio scaber</i>	15
2.6	Digitale Bildbearbeitung	16
3	Ergebnisse	17
3.1	Die Zelllinie bei <i>Porcellio scaber</i>	17
	Die Gastrulation bei <i>Porcellio scaber</i>	17
	Teilungen der Reihen und der ET bei <i>Porcellio scaber</i>	22
	Die Bildung der Reihen nicht-ektoteloblastischer Herkunft bei <i>Porcellio scaber</i>	23
	Analyse der Dauer der Zellzyklen bei <i>Porcellio scaber</i> von Zellen unterschiedlicher Stadien und Typen	42
3.2	Die Genexpression von <i>en</i> und <i>Dll</i> im postnauplialen Keimstreif von <i>Porcellio scaber</i>	43
	Der Verlauf der <i>en</i> Expression im Keimstreif von <i>Porcellio scaber</i>	43
	Die Expression des Gens <i>Dll</i> im Keimstreif von <i>Porcellio scaber</i>	49
3.3	Die Zelllinie und Genexpression bei <i>Orchestia cavimana</i>	60
	Die Expression des Gens <i>Dll</i> bei <i>Orchestia cavimana</i>	60
3.4	Genexpression und Morphogenese der Intersegmentalfurchen und Beinknospen bei <i>Orchestia cavimana</i> und <i>Porcellio scaber</i>	66
3.5	Zellablationsexperimente bei <i>Porcellio scaber</i>	69
	Die Ablation der ET bei <i>Porcellio scaber</i>	69

Die Ablation der Zelle d_3 bei <i>Porcellio scaber</i>	70
4 Diskussion.....	73
4.1 Die Bildung und Differenzierung der Reihen nicht-ektoteloblastischen Ursprungs	73
4.2 Zur Homologiefrage bezüglich der Reihen nicht-ektoteloblastischen Ursprungs bei den Peracarida	75
4.3 Zellsortierung und Zelllinie in den Reihen E(0) und E(1)	78
4.4 Das Gen <i>en</i> Expression in <i>Orchestia cavimana</i> und <i>Porcellio scaber</i>	80
4.5 Vergleich des Expressionsmusters von <i>en</i> mit dem anderer Krebse	81
4.6 Die Expression des Gens <i>en</i> bei der Segmentierung des Keimstreifs	81
4.7 Wird die <i>Dll</i> Expression durch die Zelllinie kontrolliert?	82
4.8 Die Evolution eines einästigen Beines	83
4.9 Wieviele Achsen hat ein Krebsbein?	86
4.10 Die Regulation von <i>Dll</i> in <i>Orchestia cavimana</i> und <i>Porcellio scaber</i>	87
4.11 Regulation der Zellteilungen bei <i>Porcellio scaber</i> : Zellteilungszyklen und Abhängigkeiten	90
5 Zusammenfassung	100
6 Danksagung.....	102

Multimedialer Anhang (Download)

Aufnahme 1
 Aufnahme 2
 Aufnahme 3
 Aufnahme 4
 Aufnahme 5

1 Einleitung

Einige Taxa der Metazoen, wie z.B. Nematoden, viele Spiralier und Ascidien, bilden während ihrer Embryonalentwicklung eine Zelllinie (engl. cell lineage) aus. Das bedeutet, dass sich von Beginn der ersten Teilungen an die Zellen nach einem festgelegten Muster teilen und das Schicksal der Zellen vorhergesagt werden kann. In einigen Fällen ist diese Zelllinie noch mit einer Zellkonstanz (Eutelie) gekoppelt, wie z.B. bei *Caenorhabditis elegans*.

Diese Zelllinien lassen sich in Zellstammbäumen darstellen, aus denen die Zellgenealogie des späteren Embryos erkennbar wird. Das bekannteste Beispiel hierfür ist die Arbeit von Sulston et al. (1983), in der die gesamte Zelllinie der 558 Zellen der Larve von *Caenorhabditis elegans* beschrieben wurde. Obwohl diese Zellgenealogie zunächst sehr invariant erschien und eine starke Determination des Zellschicksals durch die Abstammung suggeriert, konnten in späteren Arbeiten Abweichungen des Zellstammbaums in Zeitpunkt und Orientierung der Mitosen, sowie Induktionsprozesse und Zellwanderungen nachgewiesen werden (Bowerman 1995; Bossinger und Schierenberg 1996; Schnabel et al. 1997).

Die Ergebnisse bei *Caenorhabditis elegans* provozieren die Frage nach der Funktion einer solchen Zelllinie, da regulative Prozesse ebenfalls eine große Rolle zu spielen scheinen. Noch drängender wird diese Frage im Falle der Malacostraca (Höhere Krebse), innerhalb derer im postnauplialen Keimstreif eine Zelllinie mit einem festgelegten Zellteilungsmuster evolviert wurde (Dohle und Scholtz 1988; Scholtz und Dohle 1996). Innerhalb der Malacostraca, und so auch bei den in dieser Arbeit untersuchten Vertretern der Amphipoda (*Orchestia cavimana*) und Isopoda (*Porcellio scaber*), findet man im postnauplialen Keimstreif Reihen von Zellen im Ektoderm, die nach Längsteilungen ihre Abkömmlinge zu einem Gittermuster anordnen. Diese Zellen führen dann nach einem festgelegten Muster differentielle Teilungen durch, und bilden das Ektoderm der Segmente und Extremitäten, sowie das Nervensystem (Dohle 1970, 1972; Dohle und Scholtz 1988, 1997). Die Zellgenealogie wurde bereits an verschiedenen Vertretern der Peracarida, den Tanaidacea (Dohle 1972), Cumacea (Dohle 1970, 1976a), Mysidacea (Scholtz 1984), Amphipoda (Scholtz 1990) und

Isopoda (Hahnenkamp 1974; Vehling 1994) und an einem decapoden Krebs untersucht (Scholtz 1992, 1995a, 1995b).

Das diesen Krebsen zugrunde liegende Zellteilungsmuster bietet für Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen Zelllinie, Genexpression, Zelldetermination und Morphogenese einzigartige Voraussetzungen. Eine Zelllinie, in der sich die Zellen identifizieren lassen, und eine dadurch bedingte zellgenaue Auflösung des Expressionsmusters von Genen inklusive des Wissens über das zukünftige Schicksal der einzelnen Zellen, bietet für die Beantwortung wichtiger Fragen eine sehr gute Möglichkeit. Inwieweit wird das Zellschicksal durch die Zelllinie bestimmt? Welchen Anteil an der Festlegung des Zellschicksals hat die Expression eines Gens? Inwieweit wird die Genexpression wiederum durch die Zelllinie beeinflusst? Wodurch wird die Morphogenese stärker beeinflusst: Durch die Genexpression oder durch die Zelllinie?

Das Expressionsmuster des Segmentierungsgens *engrailed* wurde diesbezüglich bei mehreren Malakostraken untersucht (Scholtz 1992; Scholtz et al. 1993; Scholtz et al. 1994; Dohle und Scholtz 1995; Scholtz 1995a, 1995b; Scholtz und Dohle 1996). *engrailed* wird im posterioren Abschnitt eines jeden Segmentes exprimiert und kann daher als Marker von Zellreihen verwendet werden. Die Untersuchungen brachten das unerwartete Ergebnis, dass die Expression des Gens *engrailed* unabhängig von der Zelllinie reguliert wird.

Trifft dies auch für andere Gene zu? In der vorliegenden Arbeit wurde in die Untersuchungen das Gen *Distal-less* mit einbezogen. Das Gen *Distal-less* spielt eine wichtige Rolle bei der Beinentwicklung der daraufhin untersuchten Arthropoden (*Drosophila*: Cohen et al. 1989; Spinne *Cupiennius*: Schoppmeier und Damen 2001). Das Expressionsmuster von *Distal-less* wurde bereits bei verschiedenen Krebsen bezüglich der Funktion während der Achsenbildung und des evolutionären Ursprungs von Extremitäten untersucht (Panganiban et al. 1995; Panganiban et al. 1997; Popadic et al. 1998; Scholtz et al. 1998; Williams 1998; Nulsen und Nagy 1999; Olesen et al. 2001; Williams et al. 2001). Hierbei blieb jedoch eine zellgenaue Analyse des Expressionsmusters von *Distal-less* aus. An diesem Punkt setzt die vorliegende Arbeit an. Ist die *Distal-less* Expression bei Malakostraken abhängig von der Zelllinie? Inwieweit korreliert die Expression von *Distal-less* mit dem späteren Schicksal der Zellen und der Morphogenese? Doppelmarkierungen der Genprodukte von *engrailed* und *Distal-less* lassen zudem eine kombinierte Analyse der beiden Genexpressionsmuster zu. Das Genprodukt von *engrailed* spielt bei *Drosophila* eine

Schlüsselrolle bei der Regulation von *Distal-less* (Cohen 1990). Entspricht das zelluläre Muster der Genexpression dieser beiden Gene den Ergebnissen bei anderen Arthropoden?

Die Auswahl der beiden untersuchten Arten *Porcellio scaber* und *Orchestia cavimana* kann zu der Diskussion um die Rolle von *Distal-less* bei der Achsenfestlegung von Extremitäten einen wichtigen Beitrag leisten. Beide Arten bilden im Thorax einästige Beine aus, während die Pleopoden zweiästig sind. Zudem sind die Thoracopoden bei beiden Gruppen konvergent entstanden (Siewing 1951; Richter und Scholtz 2001). Welche Rolle spielt die Expression des Gens *Distal-less* und die Zelllinie bei der Ausbildung eines einästigen Beines?

Die festgelegten Zellteilungs- und Genexpressionsmuster können Merkmale für die Rekonstruktion phylogenetischer Beziehungen liefern (Dohle 1976b, 1989). Innerhalb der Peracarida, zu denen auch die Amphipoden und Isopoden gezählt werden (Calman 1904; Sieg 1984; Scholtz und Dohle 1996; Richter und Scholtz 2001), wurde die Zellgenealogie im postnauplialen Keimstreif bereits an folgenden Taxa vergleichend untersucht: Tanaidacea (Dohle 1972), Cumacea (Dohle 1970, 1976a), Mysidacea (Scholtz 1984), Amphipoda (Scholtz 1990) und Isopoda (Hahnenkamp 1974; Vehling 1994). Das Genexpressionsmuster von *engrailed* wurde an Vertretern der Mysidaceen und Amphipoden untersucht (Scholtz et al. 1993; Scholtz et al. 1994; Dohle und Scholtz 1995; Scholtz und Dohle 1996). Die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Peracarida sind weitgehend ungeklärt und ein Vergleich der Merkmale kann zur Lösung dieser Frage beitragen. Die vorliegende Arbeit fügt sich diesbezüglich in die bisherigen Untersuchungen ein, da in den Untersuchungen über die Zellgenealogie des vorderen postnauplialen Keimstreifs der Isopoden wichtige Fragen offen geblieben sind (Hahnenkamp 1974; Vehling 1994). Zudem fehlte eine detaillierte Beschreibung des Expressionsmusters von *engrailed* bei Isopoden. Durch die Beschreibung des Expressionsmusters des Gens *Distal-less* bei Isopoden und Amphipoden wurde die Anzahl der Merkmale für den Vergleich erhöht.

Für die zellgenealogischen Untersuchungen bietet die erstmals bei anderen Tieren als *Caenorhabditis elegans* angewendete 4D-Mikroskopie hervorragende Möglichkeiten. Mit dieser von Prof. Dr. Ralf Schnabel entwickelten Methode können an einem lebenden Embryo alle Zellen und Zellteilungen aufgenommen werden und mit einer dafür programmierten Datenbank analysiert werden. Durch die digitale Verstärkung der Nomarski-Optik wurde die lichtmikroskopische Beobachtung der Zellen im

lebenden Keimstreif von *Porcellio scaber* erst ermöglicht. Dies erlaubt die Erstellung eines exakten Zellstammbaumes mit einer zeitlichen und räumlichen Analyse, die mit der in den bisher durchgeführten Arbeiten angewandten Methode der Rekonstruktion der Zellgenealogie durch Einzelpräparate nicht möglich ist. Zudem sind morphogenetische Prozesse direkt am Embryo beobachtbar. Mit dieser Methode konnte die Frage nach der Reihenbildung der Zellen vor den Ektoteloblastenderivaten bei den Isopoden geklärt werden. Erstmals konnten zeitliche Analysen der Zellteilungszyklen durchgeführt werden, die der Erklärung der bei Isopoden beobachteten Unregelmäßigkeit der Teilungswellen dienen. Die 4D-Mikroskopie bietet zudem die Basis für die in dieser Arbeit durchgeführten gezielten Zellablationen, die bisherige Ergebnisse überprüft und erhärtet haben.

2 Material und Methoden

2.1 Tierhaltung

Die Kellerrassel *Porcellio scaber* wurde aus Zuchten von Angelika Weber und Dr. Beate Witzel übernommen und mit Exemplaren von einem Friedhof in Berlin Kreuzberg und aus dem Botanischen Garten Braunschweig ergänzt. Die Tiere wurden mit Laub, Mohrrüben und Haferflocken gefüttert und legten von Mitte März bis Anfang Oktober Eier. *Orchestia cavimana* wurde aus der Zucht von Dr. Matthias Gerberding übernommen, und zusätzliche Individuen wurden an der Weser bei Elsfleth, Bremen und am Tegeler See in Berlin gesammelt. *Orchestia cavimana* wurde mit Haferflocken und Mohrrüben gefüttert und legte das ganze Jahr über Eier.

2.2 Immunhistochemie

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden die Embryonen in Asselringer (0,2 mol/l NaCl; 0,022 mol/l KCl; 0,015 mol/l CaCl₂; 0,017 mol/l MgCl₂; 2,4 mmol/l NaCO₃), bzw. Orchestiaringer (0,17 mol/l NaCl; 0,0135 mol/l KCl; 9,09 mmol/l CaCl₂; 9,57 mmol/l MgCl₂; 0,83 mmol/l NaHCO₃; 1,06 mmol/l Na₂HPO₄; 0,42 mmol/l NaH₂PO₄) von den Eimembranen getrennt und die Keimstreifen danach von Dotter befreit. Zur Fixierung wurden die Keimstreifen in 4% Formaldehyd in PBS (0,01 mol/l Na₂HPO₄; 0,01 mol/l NaH₂PO₄; 0,15 mol/l NaCl in aq. Dest.; pH 7,2) überführt und dort für 15-30 min belassen. Der weitere Färbeverlauf entspricht dem von Patel (1994) beschriebenen. Nach der Fixierung wurden die Keimstreifen dreimal in PBT (PBS + 0,1% Rinderserumalbumin (BSA) + 0,1% Triton X-100) gewaschen und permeabilisiert. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden in 5% Ziegenserum in PBT abgesättigt (30 min) und danach wurden die Keimstreifen mit dem ersten Antikörper (monoklonaler Antikörper 4D9 anti-En 1:3 und/oder Antiserum aus Kaninchen anti-Dll 1:300) über Nacht bei 4° C inkubiert. Nach dem Waschen in PBT (dreimal 5 min, dreimal 30 min) wurden die Keimstreifen mit dem sekundären Antikörper inkubiert: Meerrettichperoxidase-

konjugierte anti-Maus IgG + IgM oder Meerettichperoxidase-konjugierte anti-Kaninchen IgG + IgM für Einfachmarkierungen, für Doppelmarkierungen anstatt des Meerettichperoxidase-konjugierten anti-Maus IgG + IgM der gleiche, jedoch mit alkaliner Phosphatase konjugiert (Jackson) (alle 1:400). Für die Farbreaktion wurde bei den Meerettichperoxidase-konjugierten Antikörpern DAB-Lösung (0,3 mg/ml DAB (3,3'-Diaminobenzidin, Sigma) + 1 µl/ml 0,3% H₂O₂ in PBS) 15 min lang hinzugefügt (braune Farbreaktion), für die Doppelmarkierungen wurde danach der Keimstreif in Alkaline-Phosphatasepuffer (5 mmol/l MgCl₂; 100 mmol/l NaCl; 100 mmol/l Tris, pH 9,5; 0,1% Triton X-100) überführt, dreimal darin gewaschen und in BCIP/NBC-Lösung (1 ml Alkaline-Phosphatasepuffer, 4,5 µl NBC (50 mg/ml in 70% DMF (Promega)), 3,5 µl BCIP (50 mg/ml in 70% DMF (Promega))) die Farbreaktion (blau) hervorgerufen. Die Keimstreifen wurden im letzten Waschschriff mit 0,2 µg/ml DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol, Sigma) gegengefärbt. Sie wurden in Glycerollösung (80% Glycerin in PBS mit 2,5% DABCO(1,4-Diazobicyclo-(2,2,2)-octan)) eingebettet und mit einem Deckglas auf dem Objektträger abgedeckt welches am Rand mit Vaseline versiegelt wurde. Betrachtet wurden die Objekte mit einem Axiophot (Zeiss). Die Dokumentation erfolgte auf 35 mm Diafilmen (Agfa) und mit einer digitalen Kamera (Nikon D1).

2.3 Rasterelektronenmikroskopie

Die präparierten Keimstreifen von *Porcellio scaber* und *Orchestia cavimana* wurden in 4% Formaldehyd in PBS vorfixiert, wobei durch vorsichtiges Bewegen die extraembryonale Flüssigkeit entfernt wurde. Danach wurden die Keimstreifen in Bouin's-Lösung (Gemisch von 300 ml gesättigter wässriger Pikrinsäurelösung, 100 ml 37% Formaldehyd, 20 ml Eisessig) fixiert. Nach 24-48 Stunden wurden die Keimstreifen in einer abgestuften Ethanolreihe entwässert (1 h 70% Ethanol, 30 min 80% Ethanol, 30 min 90% Ethanol, 1 h 96% Ethanol, 30 min 96% Ethanol, 1 h 100% Ethanol, 24 h 100% Ethanol). Die Kritisch-Punkt-Trocknung erfolgte mit CO₂ (CPD BAT-TEC 030). Danach wurden die Präparate besputtert (SCD BAL-TEC 005) und mit einem Leica-Rasterelektronenmikroskop betrachtet. Die Dokumentation erfolgte durch digitale Aufnahmen.

2.4 4D-Mikroskopie

Bei der 4D-Mikroskopie (Schnabel et al. 1997) handelt es sich um eine 3D-Zeitrafferaufnahme, die an lebenden, sich entwickelnden Embryonen durchgeführt werden kann. Mit dieser Methode lassen sich Zellpositionen, Zellteilungen und Zellwanderungen am Embryo aufnehmen, die später mit einer speziell dafür entwickelten Datenbank (Simi°BioCell) analysiert und dokumentiert werden können. Das Mikroskop besteht aus einem Zeiss Axioplan, ausgestattet mit differentiellm Interferenzkontrast nach Nomarski (DIC) und Optovar (1x – 4x). Eine Hamamatsu Newvicon Kamera (C2400-07) nimmt die Bilder auf und leitet sie über einen Frame-Grabber an einen Computer weiter. Dort werden die Bilder digital verstärkt und als Bitmap-Dateien auf einer Festplatte gespeichert. Ein motorisierter Shutter sorgt dafür, dass nur während der Aufnahme Licht auf das Objekt fällt, um ein Erwärmen des Embryos zu verhindern. Ein weiterer vom Computer gesteuerter Elektromotor sorgt für die Bewegung des Tisches in die definierten Fokusebenen.

Die Embryonen wurden während der Aufnahme durch einen an ein Wasserbad angeschlossenen Kupferring und Mikroskoptisch auf einer konstanten Temperatur von 25° C gehalten. Die Aufnahmen wurden entweder mit einem 100x/1,3 Öl oder 63x/1,3 Öl Neofluar Objektiv (Zeiss) durchgeführt.

Die Präparation der Embryonen für die 4D-Mikroskopie

Die Eier wurden aus dem Marsupium der Assel entfernt und das Entwicklungsstadium der Embryonen bestimmt. Aus dem Gelege wurden gezielt die Eier ausgewählt, bei denen der Keimstreif von oben sichtbar war. Damit sollte die Möglichkeit von Bewegungen während der Aufnahme reduziert werden. Auf einen Objektträger wurde ein Agarpad gebracht, indem warme, 5%ige Agarlösung aufgetropft wurde und dieser Tropfen mit einem anderen Objektträger flachgedrückt wurde. Mit einer Nadel wurden Kammern in dieses ca. 0,7 mm hohe Agarpad geschnitten, die der Größe eines Asseleies entsprechen. Danach wurde das Ei in Asselringer auf das Agarpad gegeben und mit einem auf Vaselinefüßchen abgestützten Deckglas (24x60 mm) abgedeckt. Der Rand wurde mit flüssiger Vaseline luftdicht abgeschlossen. Das Ei wurde mit viel Immersionsöl und mit einer möglichst geringen Lichtmenge bei 25° C unter dem Mikroskop aufgenommen. Die Aufnahmen wurden über das Netzwerk mit der Software Simi°BioCell überwacht,

um Bewegungen des Embryos festzustellen und gegebenenfalls mit dem Mikroskopisch den Embryo wieder in die gewünschte Aufnahme-position zu bringen.

Analyse der Zelllinien mit Simi°BioCell

Die Analyse der aufgenommenen Embryonen erfolgt mit der Software SIMI°BioCell der Firma SIMI° (Unterschleißheim). Dieses Programm ermöglicht es, die aus den Aufnahmen entstandene Datenmenge abrufbar und darstellbar zu machen und zu bearbeiten (Schnabel et al. 1997). Die Bilder einer Aufnahme werden in einem Fenster auf dem Computermonitor dargestellt (Abb. 1). Die Positionen der Zellen des Embryos werden mit der Maus für jedes Einzelbild auf dem Monitor markiert. Lage und Zeitpunkt werden dadurch gespeichert. So kann das Zellschicksal während der Entwicklung des Embryos verfolgt werden. Zellteilungen werden ebenfalls eingegeben und abgespeichert, so dass im Verlauf der Analyse ein Zellstammbaum aufgezeichnet wird, der in einem zweiten Fenster dargestellt ist. In diesem Zellstammbaum wird jede markierte Zelle mit einem roten Punkt dargestellt. Die gespeicherten Daten lassen sich als Datei im ASCII-Format ausgeben und stehen dadurch für weitere Berechnungen zur Verfügung (z.B. Teilungswinkelberechnungen). Integriert in die Software ist eine 3D-Rekonstruktionsfunktion, mit der sich aus dem Datensatz 3D-Modelle in einem dritten Fenster erstellen lassen. Mit dieser Funktion lassen sich auch Zellwanderungen darstellen.

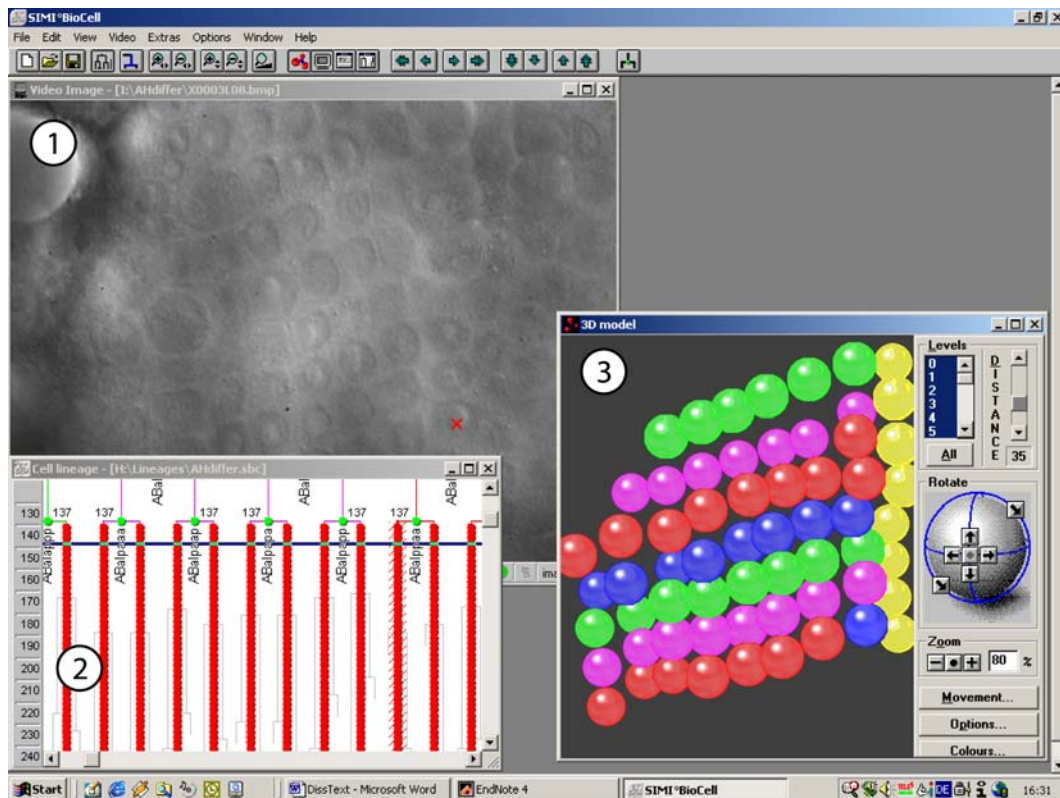


Abb. 1: **Benutzeroberfläche der Software Simi*BioCell.** Die Abbildung zeigt die verschiedenen Fenster der Analysesoftware. Fenster 1 zeigt die Bilder der Aufnahme, in denen die einzelnen Zellen per Mausklick markiert werden. In Fenster 2 ist jede bereits markierte Zelle in einem Zellstammbaum eingetragen. Auf der linken Seite befindet sich eine Zeitleiste. Die 3D-Rekonstruktion ist in Fenster 3 dargestellt. Den Zellen können Farben und Namen zugeordnet werden.

Terminologie der Zellen und Bezeichnungen der 4D-Aufnahmen

Die Zellen und Zellreihen werden nach der Terminologie von Dohle (1970) benannt, um die Vergleichbarkeit mit anderen Krebsen zu gewährleisten. Die Embryonen, deren Entwicklung mit dem 4D-Mikroskop aufgenommen wurden, werden im Text mit „Aufnahme“ und der folgenden Nummer bezeichnet. Aus den nummerierten Aufnahmen befinden sich einige Filme im Anhang auf der CD-ROM (bzw. auf der Webpage). Hier ist zu beachten, dass in den Filmen nur eine Ebene des Embryos gezeigt wird. Mit dem 4D-Mikroskop wurden jedoch jeweils 25 Ebenen aufgenommen, der Datensatz ist also viel größer als dies im Film dargestellt werden kann. Die Auswahl der Ebenen für die Filme richtete sich nach der größtmöglichen Aussagekraft für die beschriebenen Prozesse.

ET = Ektoteloblasten. Der mittlere Ektoteloblast wird mit ET_0 bezeichnet. Die lateralen ET von innen nach außen mit ET_1 , ET_2 , ET_3 usw.

e-Reihen = Reihen von Zellen, die von ET gebildet werden. Mit römischen Ziffern werden die Reihen von anterior nach posterior benannt (eI, eII, eIII, eIV usw.). Entsprechend der Bezeichnung der Ektoteloblasten werden die Zellen einer Reihe nach lateral von der Mitte durchnummeriert (eI₁, eI₂, eI₃ ...). Stadienangaben setzen sich aus der Nummer der zuletzt rechts und links abgegebenen Derivate der Ektoteloblasten zusammen, VI (3+4) bedeutet, dass auf der rechten Körperseite bereits drei Zellen der Reihe VI zu finden sind und auf der linken Seite bereits vier.

E-Reihen = Mit E werden Zellreihen bezeichnet, die nicht direkt von den Ektoteloblasten gebildet werden. Z.B. Reihe E(2), die aus der vor den Ektoteloblasten gelegenen Zellreihe B entsteht.

a, b, c, d = Buchstaben für die Zellreihen, die aus der zweimaligen Teilung einer Reihe von Zellen gebildet werden. Die einzelnen Zellen werden von innen nach außen durchnummeriert, z.B. entspricht die Bezeichnung a₃ der dritten Zelle der Reihe a von der Mittellinie.

r und l = Die Buchstaben bezeichnen die morphologisch rechte (r) und linke (l) Hälfte des Keimstreifs. Durch die Aufsicht auf die ventrale Seite des Keimstreifs ergibt sich, dass die Zellen auf der linken Seite die rechte Körperhälfte bilden.

e und i, v und h = Außen (e) und innen (i) und vorne (v) und hinten (h). Hiermit werden die Abkömmlinge der differentiellen Teilungen bezeichnet. e und i bezeichnen Zellen, die relativ zur Mittellinie median bzw. lateral zu liegen kommen. v und h bezeichnen Zellen, die entlang der anterioposterioren Körperachse zu liegen kommen.

2.5 Zellablationsexperimente an *Porcellio scaber*

Erfolgreiche Zellablationen waren nur bei *Porcellio scaber* möglich. Die Zellen von *Orchestia cavimana* zeigten aufgrund der Einlagerung von Calcium eine Resistenz gegen den Laserbeschuss.

Die Präparation der Eier für die Ablationsexperimente erfolgte wie für die 4D-Mikroskopie. Die Ablationen wurden mit einem Farbstofflaser (VSL-337ND, Laser

Science Inc., Farbstoff: Coumarin2, $\lambda = 453 \text{ nm}$) durchgeführt, der an einem Zeiss Axioplan Mikroskop angebaut ist. Die Stärke des Lasers wurde vor jedem Experiment überprüft, indem in ein Deckglas mit dem Laserstrahl ($\text{Puls} = 20 \text{ s}^{-1}$) Löcher gebrannt wurden, deren Größe der Stärke des Lasers direkt proportional ist. Bei Ablationen von Zellen des Keimstreifs betrug die Größe der Löcher $1,2 - 1,7 \text{ cm} \times 2,0 - 2,6 \text{ cm}$ (Messung am Monitor bei 3fach Zoom des Optovars). Während diese Stärke für die Ablation von Ektoteloblasten notwendig war, musste die Stärke des Lasers bei der Ablation von Zellen im Stadium kurz vor und während der differentiellen Teilungen mit einem Filter mit dem Faktor 2 innerhalb des Strahlenganges des Lasers abgeschwächt werden. Die Dauer der Bestrahlung mit dem Laser betrug in beiden Fällen ungefähr 1,2 s. Bei ablatierten Zellen wurde mit einer 4D-Aufnahme nach Beschuss überprüft, ob diese eine Mitose durchführten. Bei Teilungsunfähigkeit galt die Zelle als ablatiert. Im Falle eines zu starken Beschusses starb der Embryo nach ungefähr 2 h.

2.6 Digitale Bildbearbeitung


Die digitale Bildbearbeitung erfolgte mit Photoshop 6.0 (Adobe), die Beschriftung und Anordnung in Tafeln mit Illustrator 9.0 (Adobe). Für die Bearbeitung der Filme wurde Premiere 6.0 (Adobe) oder HyperCam 1.51 (Hyperionics) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Die Zelllinie bei *Porcellio scaber*

Die Gastrulation bei *Porcellio scaber*

Das centrolecithale Ei von *Porcellio scaber* furcht sich superfiziell. Die Kerne wandern im 16- bis 32-Zell-Stadium an die Oberfläche des Eies, wo sie sich zu einer zelligen Keimscheibe aggregieren (McMurrich 1895). Hier beginnen die Zellen mit Teilungen (Abb. 2A). Diese Zellteilungen finden in Teilungswellen statt, welche die ganze Keimscheibe durchziehen. Hierbei sind vorerst keine Zellimmigrationen zu beobachten. Kurz bevor eine Teilungswelle beginnt, sind in der Zeitrafferaufnahme

(Aufnahme 1 ) leichte Kontraktionen der gesamten Keimscheibe zu erkennen. Die Dauer einer Teilungswelle betrug für den untersuchten Embryo ungefähr 5 h. Diese Teilungswelle ist ungerichtet, das heißt sie verläuft nicht von innen nach außen oder umgekehrt (Abb. 2B). Die Pause bis zum Beginn der nächsten Teilungswelle betrug ungefähr 18,5 h, die darauffolgende Teilungswelle dauerte ungefähr 7,5 h. Zwischen diesen Zeitpunkten beginnt bei *Porcellio scaber* die Gastrulation. Zellen, die das Gastrulationszentrum bilden, sinken langsam in die Keimscheibe ein (Abb. 2C, D, E). Das Einsinken der Zellen erfolgt über den gesamten Zeitraum, wobei diese Immigration durch Zellteilungen am Rand des Gastrulationszentrums unterstützt wird, indem sich Tochterzellen über die immigrierenden Zellen schieben (Abb. 2F). Vereinzelt sind auch Zellen zu beobachten, deren Teilungsspindeln stark radial positioniert sind, so dass auch Zellen nach unten abgegeben werden. Die Gastrulationsbewegung bei *Porcellio scaber* setzt sich demzufolge aus einer Kombination der drei Gastrulations-Grundmodi Immigration, Delamination und Invagination zusammen. Hierbei stellt jedoch die Immigration die Hauptbewegung dar.

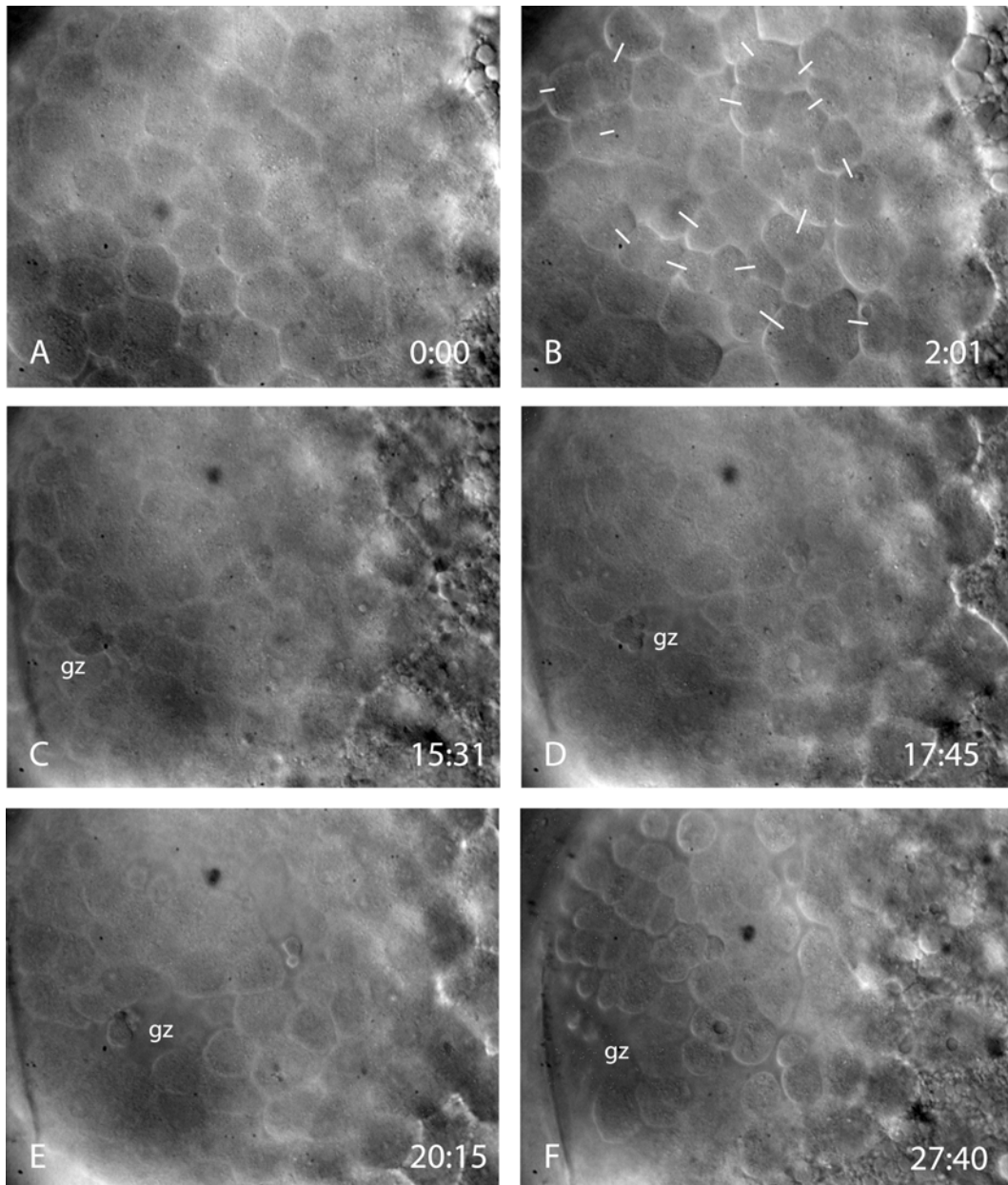


Abb. 2: **Bilder aus der 4D-Aufnahme des Gastrulationsvorganges bei *Porcellio scaber*** (Aufnahme 1). (A) Beginn der Aufnahme. Die Zellen bilden eine Keimscheibe an einem Rand des Eies. (B) Teilungswelle in der Keimscheibe 2 h nach Beginn der Aufnahme. Die Teilungen sind ungerichtet. Die Tochterzellen sind durch Striche miteinander verbunden. (C) Beginn der Gastrulation im Gastrulationszentrum (gz) 13 h nach der letzten Teilungswelle. (D, E) Weiteres Einsinken von Zellen im Gastrulationszentrum zwischen den Teilungswellen. (F) Die Zellen nehmen eine Kugelform an, was die folgende Teilungswelle ankündigt. Unten rechts Zeitangabe in Stunden und Minuten.

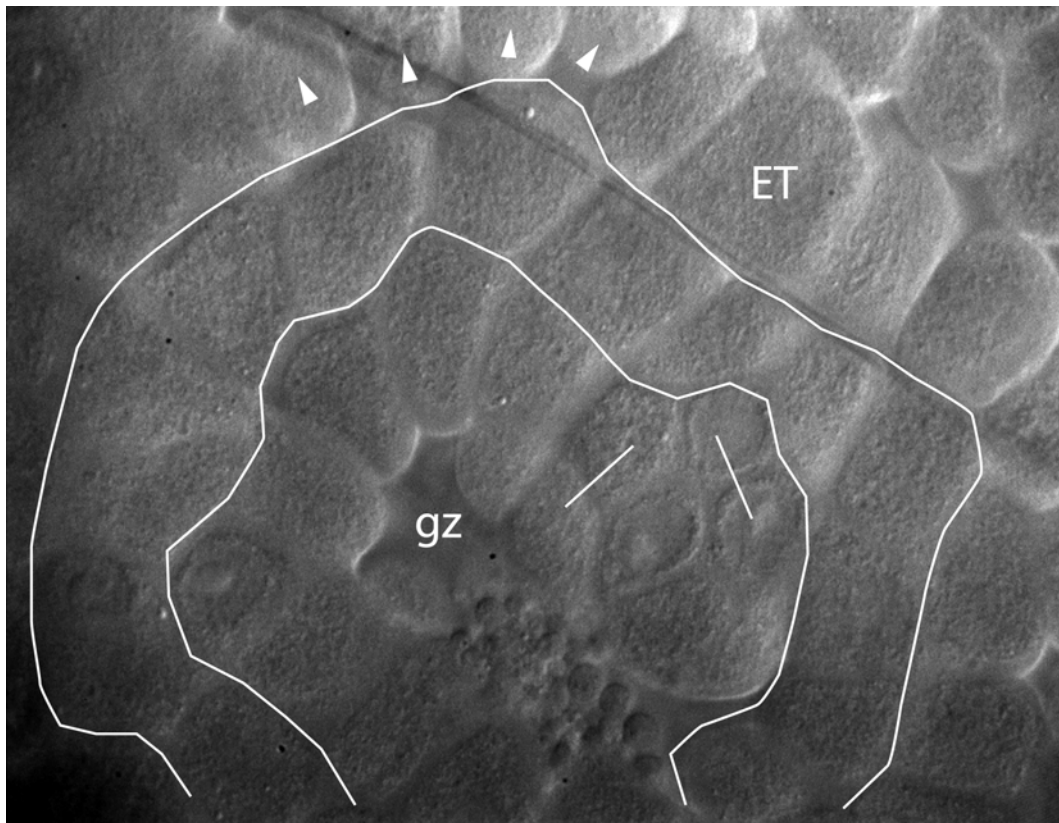


Abb. 3: **Die Zellen um das Gastrulationszentrum bei *Porcellio scaber*.** Direkt um das Gastrulationszentrum (gz) befinden sich Zellen, die zum Zentrum hin Zellen abgeben. Die Zellen des inneren Ringes sind durch die weißen Linien eingegrenzt. Sie geben später Zellen nach posterior, zum Gastrulationszentrum ab. In einem weiter äußeren Ring befinden sich die Ektoteloblasten (ET). Die mit den Pfeilspitzen markierten Ektoteloblasten geben nach anterior (Pfeilspitzenrichtung) Zellen ab (Beginn der ersten Teilungswelle). Tochterzellen sind durch Balken miteinander verbunden.

Die Formierung der Ektoteloblasten und der davor liegenden Zellen

Im Verlaufe der Gastrulation ordnen sich um das Gastrulationszentrum die Zellen in Ringform an. Hierbei lassen sich drei Ringe unterscheiden (Abb. 3): Direkt um die einsinkenden Zellen befinden sich Zellen, die sowohl Querteilungen als auch Teilungen zum Gastrulationszentrum hin vollziehen. Die Teilungen sind äqual und drängen die Zellen weiter in das Gastrulationszentrum ab. Weiter außen befindet sich ein Ring von Zellen, die im späteren Verlauf der Entwicklung ausschließlich nach posterior Zellen abgeben. Sie grenzen anterior an die sich ausdifferenzierenden ET. Die ET sind in diesem Stadium die größten Zellen und in einer zunächst stark gekrümmten Reihe angeordnet (Abb. 3). Die ET werden im weiteren Verlauf der Entwicklung nur nach anterior Zellen abgeben und dadurch den hinteren Teil des Ektoderms des postnauplialen Keimstreifs bilden. Vor diesen zwei Reihen befinden sich kleinere Zellen, die nicht in einem Reihenmuster angeordnet sind und nicht von differenzierten ET stammen (Abb. 4A). Der mediane ET, der anterior des

Gastrulationszentrums entlang der Anterioposterior-Achse (A/P-Achse) liegt, wird als ET_0 bezeichnet. Er liegt in der Reihe der ET etwas niedriger gegenüber den benachbarten ET und bildet im weiteren Verlauf durch die Abgabe der Derivate die Mittellinie des Embryos.

Vor der Reihe der ET befinden sich kleinere ungeordnete Zellen (Abb. 4A). Aus ihnen bildet sich später der naupliale Bereich und der vordere Teil des postnauplialen Bereichs. Die Zellen ordnen sich im weiteren Verlauf in Reihen an, die ich als A und B bezeichne. Bevor durch eine Teilung der differenzierten ET eine Reihe von Zellen nach anterior abgegeben wird (Reihe eI), teilen sich die inneren drei Zellen, die sich vor dem medianen ET_0 befinden (Abb. 4B). Die Spindel der beiden äußeren der drei Zellen ist etwas zur Seite versetzt. Aus ihnen werden die inneren Zellen der Reihe A und B, A_1 und B_1 . Die innere Zelle gehört zu der medianen Längsreihe. Ihre beiden Tochterzellen bilden später die medianen Zellen A_0 und B_0 . Zu diesem Zeitpunkt liegt der mediane ET_0 gegenüber den anderen ET etwas tiefer und nach hinten versetzt. Dieser gliedert sich erst nach der Abgabe des medianen ET-Derivats eI_0 in die Reihe der anderen ET ein. Die anderen Zellen vor den ET haben sich wahrscheinlich durch Teilungen ähnlich denen der drei mittleren Zellen vermehrt und wurden nicht durch ET abgegeben. Eine Bildung der Reihen A und B aus einer Zellreihe kann nicht ausgeschlossen werden.

Die Zellen, die vor den ET liegen, bilden die Reihen A und B. Hierbei liegen die Zellen nicht direkt vor den ET-Derivaten, sondern leicht versetzt. Beide Reihen bilden nach einer Teilungswelle vier Reihen von Zellen (Abb. 4). Die Rekonstruktion der Mutterzellen aus den Derivaten aus der 4D-Aufnahme hat ergeben, dass die Position der Zellen zu Beginn unregelmäßig ist (Abb. 5). Einzelne Zellen, die später die Reihe A bilden, grenzen an die ET. Diese Tatsache macht eine sichere Zuordnung von Zellen zu den Reihen A und B in Präparaten unmöglich.

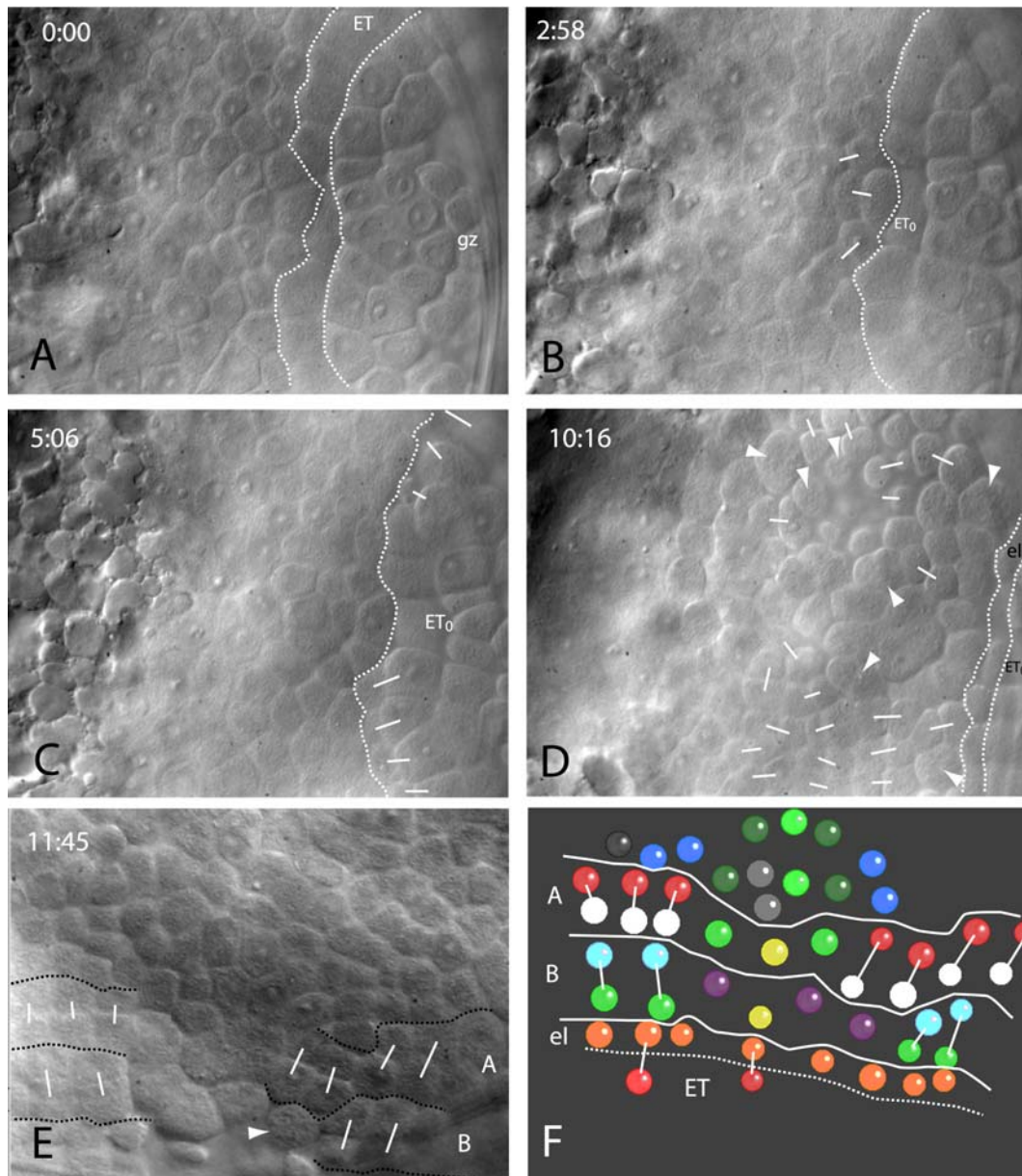



Abb. 4: **Abgabe der Reihe el und Teilungen der Reihen A und B bei *Porcellio scaber*.** Bilder aus Aufnahme 2. (A) Beginn der Aufnahme. Die Reihe der Ektoteloblasten (ET) ist durch zwei gestrichelte Linien eingegrenzt. Das Gastrulationszentrum (gz) liegt posterior. (B) Nach drei Stunden haben sich die inneren drei Zellen vor der Zelle ET₀ geteilt. Die Tochterzellen sind durch einen weissen Balken verbunden. (C) Die Abgabe der Reihe el von den ET hat begonnen. Die rechten ET und die äußeren der linken Körperhälfte haben bereits ihre Derivate nach anterior abgegeben. ET₃, ET₂ und ET₀ werden sich kurz darauf teilen. (D) Die Teilung der Reihen A und B. Eine Teilungswelle durchzieht den vorderen Bereich des Keimstreifs. Die bereits abgegebene Reihe der ET-Derivate el ist durch die Strichellinien eingegrenzt. Tochterzellen sind verbunden, Zellen in Teilung sind durch weiße Pfeilspitzen markiert. Die meisten Teilungen der sich vor der Reihe el befindenden Zellen erfolgen in anterioposteriore Richtung. Die medianen Zellen haben sich noch nicht geteilt. (E) Die lateralen Zellen der Reihen A und B haben sich geteilt; die Tochterzellen sind durch Balken verbunden. Der Pfeil markiert die sich in Prophase befindende Zelle B_{2r}. (F) Ausschnitt aus dem mit Simi[®]BioCell erstellten Modell. Gleiches Stadium wie (E). Die ET-Derivate sind orange dargestellt, davor befindet sich die Reihe B. Die Zellen, die die Reihe E(3) bilden sind grün abgebildet, die Zellen die E(2) bilden, türkis. Anterior dazu die hinteren Abkömmlinge der Reihe A, die die Reihe E(1) bilden (weiß) und die davor die Zellen, die später Teile des Mandibelsegmentes bilden (rot). Die inneren Zellen der Reihe A (grün) und B (violett), haben sich noch nicht geteilt.

Teilungen der Reihen und der ET bei *Porcellio scaber*

Die Bildung der Reihe el

Die Abgabe der ersten ET-Abkömmlinge erfolgt direkt nach der Teilung der drei medianen Ektodermzellen, aus denen sich die Zellen A₀ und B₀, sowie auf beiden Körperhälften die Zellen A₁ und B₁ bilden. Die Aufnahme 2  zeigt, dass die Abgabe der ET-Derivate noch nicht einer Teilungswelle von innen nach außen folgt, wie dies bei den späteren Teilungswellen zu beobachten ist (Tab. 1 und Abb. 4C). ET₂ kann sich z.B. vor ET₁ teilen und ET₅ vor ET₂. Der mediane ET₀ teilt sich erst sehr spät. Die Dauer der ersten Teilungswelle beträgt ungefähr 5 h. Während in diesem Fall die Teilungswelle der ET der linken Körperhälfte von innen nach außen verläuft, verläuft die der rechten Körperseite von außen nach innen (Abb. 4C, Tab. 1).

Tab. 1: Reihenfolge der ET-Teilungen der ersten, zweiten und dritten Teilungswelle (Abgabe der Reihen el, ell und eIII). Die Zeitpunkte wurden drei unterschiedlichen Aufnahmen entnommen.

Reihenfolge	Abgabe Derivat eI		Abgabe Derivat eII		Abgabe Derivat eIII	
	ET	Zeitpunkt (min)	ET	Zeitpunkt (min)	ET	Zeitpunkt (min)
1	ET _{2l}	0	ET _{1l}	0	ET _{2l}	0
2	ET _{1l}	15	ET _{3l}	15	ET _{2r}	17
3	ET _{3l}	60	ET _{2l} /ET _{4l}	30	ET _{3r}	19
4	ET _{4l}	63	ET _{5l}	51	ET _{4r}	31
5	ET _{3r}	81	ET _{4r}	78	ET _{3l}	40
6	ET _{5r}	90	ET ₀	114	ET _{4l}	60
7	ET _{4r}	90	ET _{5r}	135	ET _{5r}	95
8	ET _{2r}	156	ET _{2r}	219	ET _{5l}	116
9	ET ₀	192	ET _{3r}	228	ET _{6l}	137
10	ET _{1r}	252	ET _{1r}	261	ET ₀ und beide ET ₁ haben sich bereits vorher geteilt	

Die Bildung der ET-Derivate ell bis eXIV

Die Bildung der weiteren ET-Derivate erfolgt immer deutlicher in einer Teilungswelle von innen nach außen (Tab. 1). Hier kann es zu geringen Unregelmäßigkeiten kommen. Mit der fortschreitenden Abgabe der ET-Derivatereihen entspricht die Teilungswelle immer stärker einer von innen nach außen

verlaufenden Abfolge von Mitosen, in denen meist die Mitosestadien in der rechten und linken Körperhälfte übereinstimmen (Tab. 1). Eine Teilungswelle wird zunächst abgeschlossen bevor sich die ET nochmals teilen und beginnt ungefähr zu dem Zeitpunkt, an dem sich die dritte bereits abgegebene Reihe der ET-Derivate teilt.

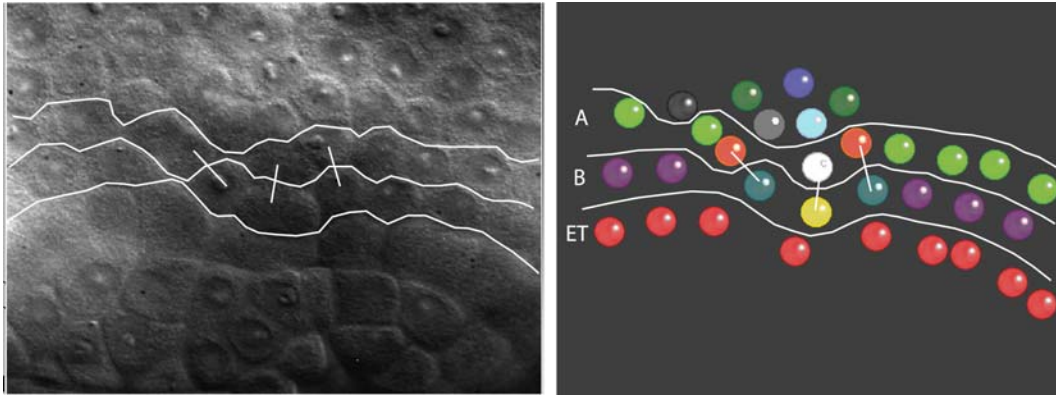


Abb. 5: **Rekonstruktion der Reihen A und B aus Aufnahme 2.** Die weißen Linien trennen die Zellen der Reihe A und B. Auf dem Originalbild (links) weisen die Pfeile auf Zellgrenzen, an denen Zellen der späteren Reihe A an die ET grenzen und Zellen anterior zu der Reihe A an Zellen der Reihe B.

Die Bildung der Reihen nicht-ektoteloblastischer Herkunft bei *Porcellio scaber*

Die Teilung der Reihen A und B bei *Porcellio scaber*

Nach der Abgabe der ersten ET-Derivatreihe teilen sich die vor der Reihe eI gelegenen Zellreihen A und B jeweils einmal nahezu zeitgleich (Abb. 4D, E, F und Tab. 2, sowie Aufnahme 2). Beeinflusst wird diese Teilung weniger durch die ektoteloblastischen Teilungen, sondern vielmehr durch eine Teilungswelle, die den nauplialen Teil des Keimstreifs nach posterior durchzieht (Abb. 4D). Die Teilung der Reihen A und B beansprucht genauso viel Zeit, wie für eine ET Teilungswelle benötigt wird (cirka 300 min). Die inneren Tochterzellen A_1 und B_1 und A_0 und B_0 teilen sich als letzte Zellen, entsprechend ihres zeitlich gegenüber den anderen Zellen verschobenen Zellzyklus (Tab. 2). Aus der Reihe A entstehen die Reihen A1 und A2 und aus der Reihe B die Reihen B1 und B2. Aufgrund der folgenden Teilungen werden die Reihen B1 und B2 analog zu Dohle (1970) als E(2) und E(3) bezeichnet. Dohle (1970) bezeichnet die aus der Teilung der Reihe A bei *Leptochelia* resultierenden Reihen als E(0) und E(1). Aufgrund der Unregelmäßigkeiten, die bei der Sortierung der Zellen in die Reihen E(0) und E(1) bei *Porcellio scaber* vorkommen

(Abb. 7), werden hier die Tochterreihen der Reihe A zunächst weiterhin mit A1 und A2 bezeichnet.

Während der Teilungen in den Reihen A und B, ordnen sich die Zellen immer stärker in regelmäßigen Reihen an (Abb. 4E, F). Aus diesem Teilungsprozess resultieren vier Reihen von Zellen, die vor den Reihen der ersten ET-Derivate gelegen sind. Die Tochterzellen der Reihe B sind deutlicher in Reihen angeordnet als die Tochterzellen der Reihe A.

Tab. 2: Zeitpunkte der Mitosen in den Reihen A und B und A1 und A2 aus der Aufnahme 2. Die zweiten Teilungen der Reihe B konnten nicht angegeben werden, da diese sich ausserhalb des Bildes befanden.

Abfolge	Zelle	Zeitpunkt (min)	Tochterzelle anterior	Zeitpunkt	Zellzyklusdauer (h)	Tochterzelle posterior	Zeitpunkt	Zellzyklusdauer (h)
1	A ₃ l	0	A ₁ l	1383	16,8	A ₂ l	1293	15,3
2	B ₂ l	314	-	-	-	-	-	-
3	A ₄ l	338	A ₁ l	1551	14,0	A ₂ l	1569	14,3
4	A ₂ l	350	A ₁ l	1458	12,2	A ₂ l	1473	12,5
5	A ₂ r	374	A ₁ l	1605	14,3	A ₂ r	1578	13,8
6	A ₅ r	353	A ₁ l	1443	11,9	A ₂ l	1356	10,5
7	B ₄ r	386	-	-	-	-	-	-
8	A ₄ r	398	A ₁ l	1560	13,1	A ₂ l	1494	12,0
9	B ₃ l	407	-	-	-	-	-	-
10	B ₃ r	428	-	-	-	-	-	-
11	A ₃ r	473	A ₁ l	1659	13,5	A ₂ l	1650	13,4
12	B ₂ r	521	-	-	-	-	-	-
13	B ₁ l	521	-	-	-	-	-	-
14	A ₁ l	524	A ₁ l	1593	11,5	A ₂ l	1596	11,6
15	A ₁ r	524	A ₁ l	1593	11,6	A ₂ l	1578	11,3
16	B ₁ l	542	-	-	-	-	-	-
17	A ₀	563	A ₁ l	1572	10,6	A ₂ l	1569	10,5
18	B ₀	602	-	-	-	-	-	-
Mittelwert					x = 12,9			x = 12,5

Die Teilungen der Abkömmlinge von Reihe A bei *Porcellio scaber*

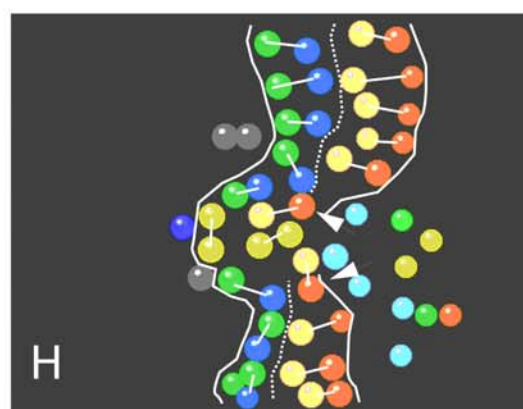
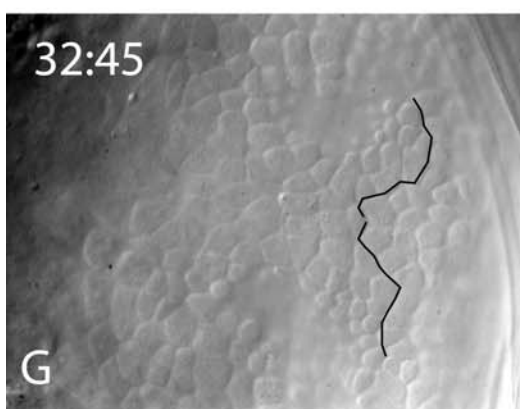
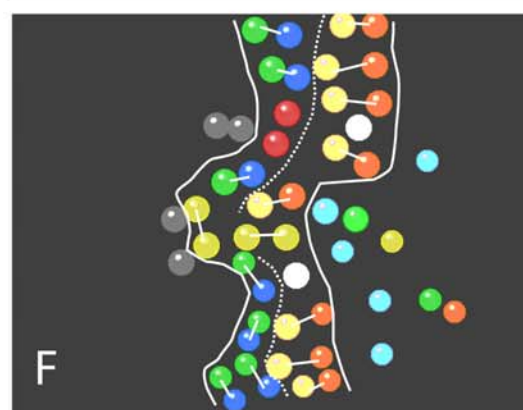
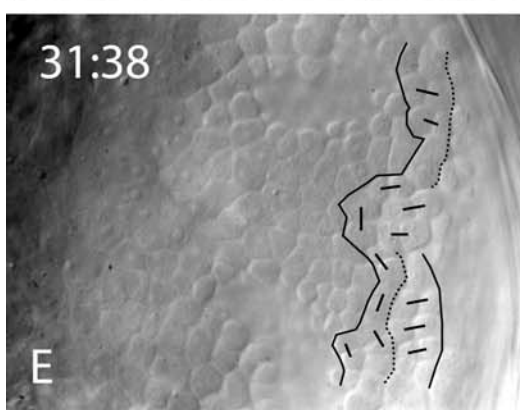
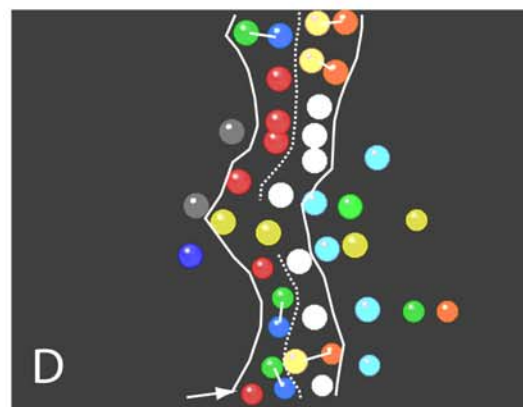
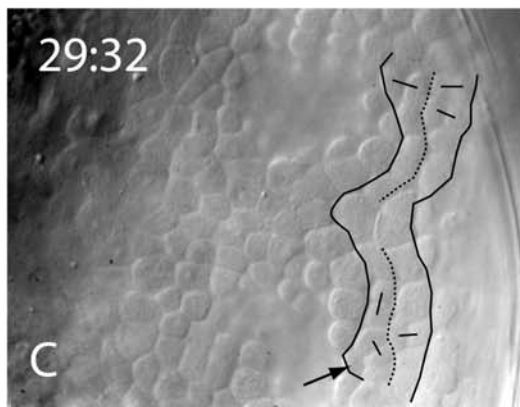
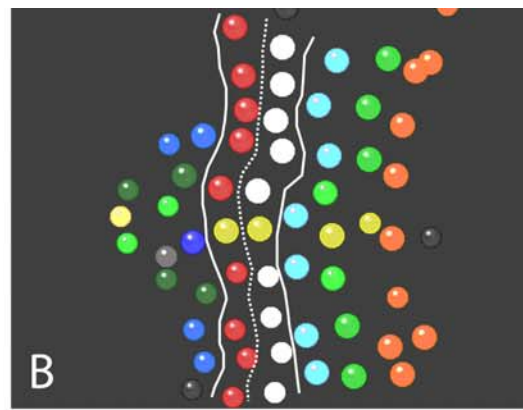
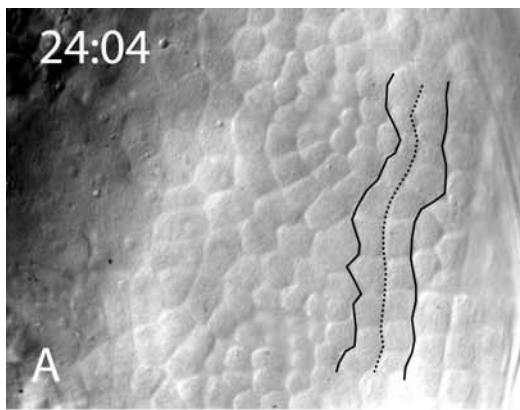
Nachdem die E1 die zweite Derivatreihe abgegeben haben und bevor sich die Abkömmlinge der Reihe B, E(2) und E(3) teilen, beginnen die Abkömmlinge der Reihe A, (Reihe A1 und A2) mit Teilungen. Auch hier verlaufen die Teilungen nicht in einer gerichteten Teilungswelle (Abb. 6). Lateral gelegene Zellen teilen sich vor den inneren ihrer Reihe (Abb. 6C, D, E und F, Tab. 2). Die Teilungsreihenfolge der Zellen einer Reihe entspricht ungefähr der der Mutterreihe. In dem aufgenommenen Embryo (Aufnahme 2) teilt sich z.B. die Zelle A₃l mit einem deutlichen Vorsprung als erste Zelle ihrer Reihe (Tab. 2). Ihre Tochterzellen A1₃l und A2₃l sind bei der folgenden Teilung ebenfalls die ersten Zellen, die mit einem großen Vorsprung gegenüber den anderen Zellen ihrer Reihe mit der Zellteilung beginnen. Korrelationen dieser Art sind ebenfalls bei anderen Zellen zu beobachten (Tab. 2).

Die Anordnung der Abkömmlinge der Reihe A in die Reihen E(0) und E(1) ist nicht bilateralsymmetrisch (Abb. 6G, H und Abb. 7) wie bei den Zellen der B-Reihen E(2) und E(3) (Abb. 8). Im medianen Bereich geben die Zellen ihre Abkömmlinge nicht immer in Längsrichtung ab, sondern es kommen auch Querteilungen vor (Abb. 6E, F). Verbindet man die Tochterzellen mit Linien, zeigt sich deutlich, dass die klonale Zusammensetzung nicht bilateralsymmetrisch ist (Abb. 7). Auch können Zellen der Reihe A1 nach vorne, vor die Schwesterzellen ihrer Reihe wandern (Abb. 6C, D) oder Zellen aus der vorderen Reihe sich in die hintere einordnen (Abb. 7). Die Entscheidung, welche medianen Abkömmlinge welche Rolle innerhalb der Reihe E(1) einnehmen, scheint nicht durch die Zelllinie festgelegt zu sein, sondern vielmehr durch einen übergeordneten Faktor. Dies macht die Identifikation der Schwesterzellen der Reihe A in den präparierten Keimstreifen unmöglich.

Durch die immunhistochemische Markierung des Genproduktes *Engrailed* (En) in den präparierten Keimstreifen erhält man eine Orientierungshilfe, da *engrailed* (*en*) in den vorderen Abkömmlingen einer Reihe exprimiert wird. Der Streifen En positiver Zellen der vorderen Abkömmlinge der Reihe E(2) ist in den Präparaten ein deutlicher Marker. Die davor befindlichen Zellen sind die hinteren Abkömmlinge der Reihe A2. Ebenso exprimieren die vorderen Abkömmlinge der Reihe A2 *en* (Abb. 11).

Eine Zuordnung der Zellen zu der Reihe E(1) kann mit Hilfe der En-Markierung vollzogen werden, allerdings erst, wenn sich die Abkömmlinge der Reihe A angeordnet haben. Die Expression des Gens *en* besitzt im anterior gelegenen

Abkömmling von E(1), E(1)ab eine gewisse Regelmäßigkeit. Das wiedererkennbare Teilungsmuster der Zellen aus E(1) hilft ebenso bei der Zuordnung der Zellen in die Reihen (Abb. 11). Die medianen Zellen der Abkömmlinge von A besitzen ebenfalls kein wiedererkennbares, bilateralsymmetrisches Teilungsmuster. Schwesterzellen sind dadurch in den Präparaten ebenfalls nicht identifizierbar (Abb. 7).



Beschriftung auf der folgenden Seite

Abb. 6: **Teilungen der Abkömmlinge von Reihe A bei *Porcellio scaber*.** Links Bilder aus Aufnahme 2, rechts entsprechendes Modell aus der 3D-Rekonstruktion. Zeit in h und min nach Beginn der Aufnahme (siehe Abb. 4). (A) Stadium vor Beginn der Teilungen. Reihe A ist durch die durchgehenden Linien eingegrenzt. Die gestrichelten Linien trennen die anterioren (A1) und posterioren Abkömmlinge (A2). (B) Kugelmodell. Zellen der Reihe A1 in rot, Zellen der Reihe A2 in weiss, mediane Zellen in gelb. Türkis: Reihe E(2), grün: Reihe E(3). In orange: ET-Derivate der Reihe el. (C, D) Tochterzellen sind mit Balken verbunden. Die resultierenden Zellen der Reihe A1 sind im Kugelmodell grün (anterior) und blau (posterior) eingefärbt, die der Reihe A2 hellgelb (anterior) und orange (posterior) eingefärbt. Die Zellen außerhalb der Reihe sind nicht vollständig eingetragen. Eine noch nicht geteilte Zelle der Reihe A1 (Pfeil) ist nach anterior gewandert. (E, F) Fast alle Zellen der Reihe A sind bereits geteilt. Während die Zellen der rechten Körperhälfte aus Reihe A1 eher Querteilungen durchgeführt haben, teilten sich die Zellen der linken Hälfte entlang der A/P-Achse. In der Originalaufnahme sind die hinteren Zellen außerhalb der Fokusebene. (G, H) Alle Abkömmlinge der Reihe A haben sich geteilt. Aus der hinteren Reihe A2 haben sich zwei innere Zellen etwas nach vorn verschoben (Pfeilspitzen). Im Bild der Aufnahme ist nur die anteriore Grenze der Reihe A eingezeichnet.

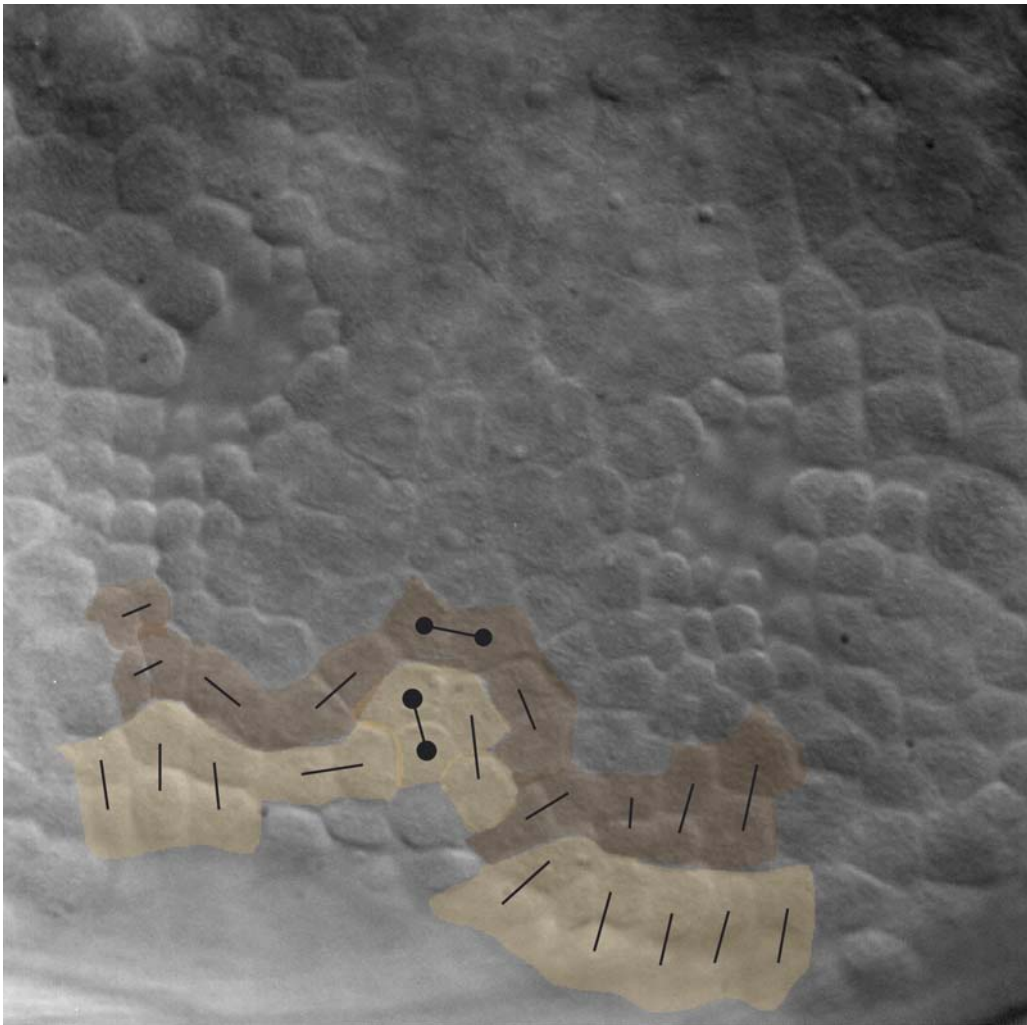



Abb. 7: **Rekonstruktion der klonalen Zusammensetzung der Reihen E(0) und E(1) bei *Porcellio scaber*.** Die Tochterzellen sind mit schwarzen Balken verbunden. Die Markierungsbalken der medianen Zellen der Reihen besitzen Keulchen. Die hell eingefärbten Zellen gehören zu Zellen der Reihe A2, die dunkel eingefärbten Zellen der Reihe A1. Das Teilungsmuster der Reihen ist nicht bilateralsymmetrisch. Eine Zelle aus dem Klon der Reihe A1 ordnet sich in die Gruppe der Zellen aus Reihe A2 ein.

Die erste Teilung der Reihen E(2) und E(3)

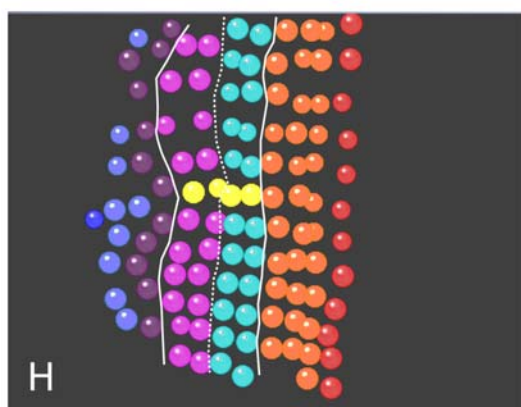
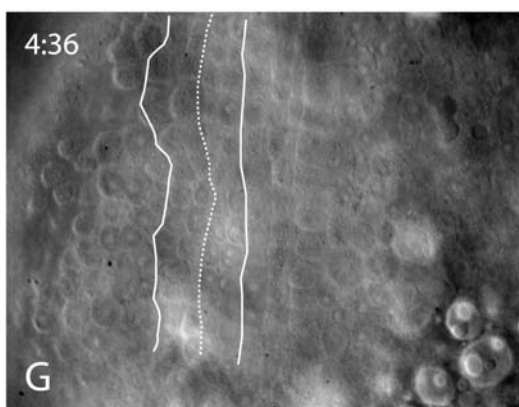
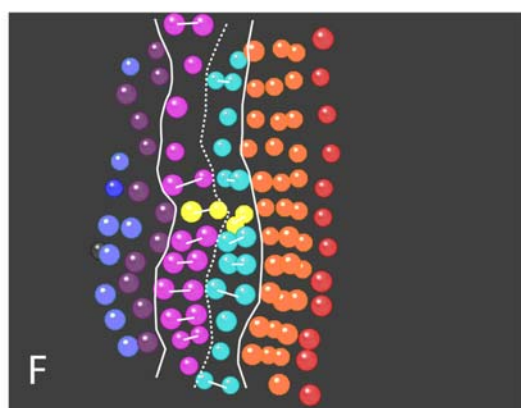
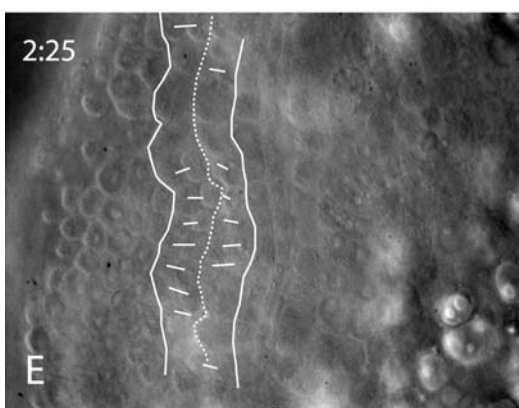
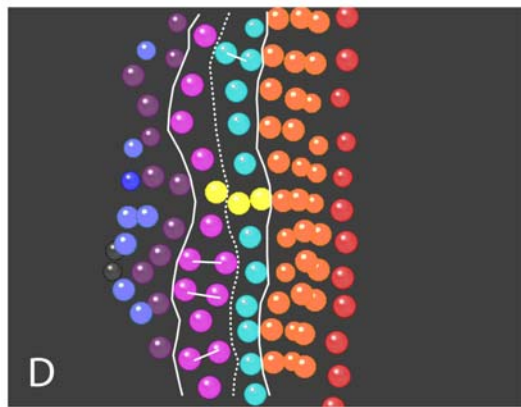
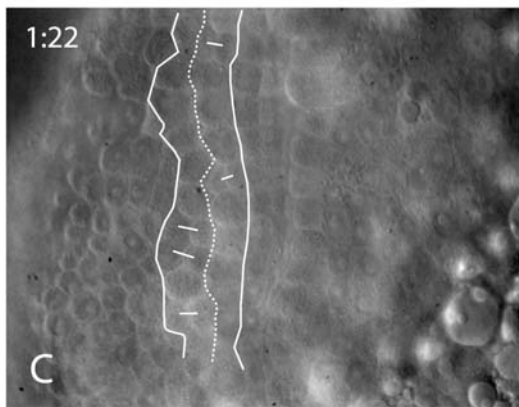
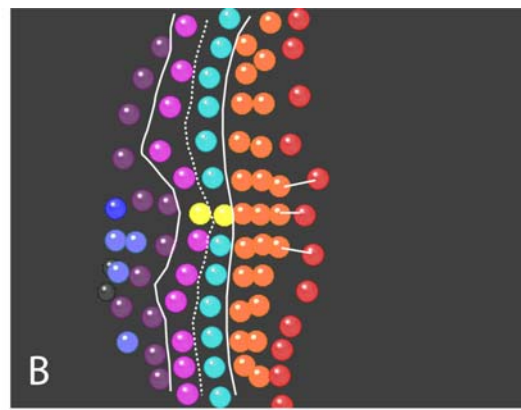
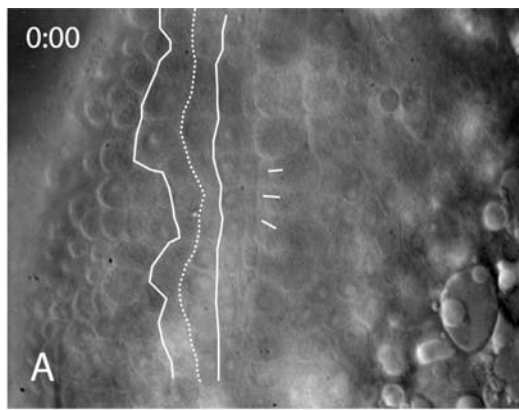
Für die Analyse der Teilungen der Reihen E(2) und E(3) liegt eine Aufnahme an einem lebenden Embryo vor, die sich im Entwicklungsstadium mit der Aufnahme 2

anfänglich überschneidet (Aufnahme 3  Aufnahme3.avi). Der Aufnahmebereich umfasst bei diesem Embryo die hinteren Zellen der Reihe A, die Reihen E(2) und E(3), sowie die ET-Derivate inklusive der sie bildenden ET.

Während der Abgabe der Reihe eIII von den ET und bevor die Reihe eIV abgegeben wird, teilt sich die Reihe E(2) in die Reihen E(2)ab und E(2)cd (Tab. 1, Tab. 3). Zeitgleich teilt sich die Reihe E(3) in die Reihen E(3)ab und E(3)cd (Abb. 8 und Tab. 3). Zu diesem Zeitpunkt haben sich noch nicht alle Zellen der Reihen A das zweite Mal geteilt. Beide Teilungswellen verlaufen nicht gerichtet. Die Abfolge der Teilungen ist im aufgenommenen Individuum (Aufnahme 3) wie in Tab. 3 beschrieben und in Abb. 8 gezeigt. Die Zellen der Reihen E(2) und E(3) sind nach den Teilungen deutlich in jeweils zwei Reihen angeordnet. Die Tochterzellen liegen direkt hintereinander und die Zellen der Reihe E(3)cd liegen direkt vor den entsprechenden Zellen der Reihe eI.

Tab. 3: Zeitpunkte der Teilungen in den Reihen E(2) und E(3). Entnommen aus Aufnahme 3. Zeitpunkt null entspricht der ersten Teilung in den Reihen.

Reihenfolge	Zelle Reihe E(2)	Zeitpunkt (min)	Zelle Reihe E(3)	Zeitpunkt (min)
1	3r	0	4l	15
2	2r	12	0	15
3	5r	15	2r	21
4	1r	36	1l	30
5	4r	42	1r	33
6	0	45	3r	54
7	5l	57	6r	69
8	1l	66	4r und 3l	84
9	3l	102	5r	96
10	4l	135	5l	135
11	2l	210	2l	138



Beschriftung auf der folgenden Seite

Abb. 8: **Verlauf der Teilungen von Reihe E(2) und E(3) aus Aufnahme 3.** Die linken Bilder zeigen die lichtmikroskopischen Aufnahmen des Embryos, die rechten Bilder zeigen die Modelle des gleichen Stadiums mit Simi°BioCell rekonstruiert. ET: rot, ET-Derivate: orange, Reihe E(2): pink, Reihe E(3): türkis, mediane Zellen gelb. Tochterzellen sind durch Balken verbunden, Zeitangabe in h:min. (A, B) Beginn der Aufnahme nach Abgabe der inneren drei ET-Derivate der Reihe eIII. Die Zellen der Reihen E(2) und E(3) haben sich noch nicht geteilt. (C, D) Beginn der Teilungen. Äussere Zellen teilen sich vor den inneren. Es ist keine gerichtete Teilungswelle erkennbar. Reihe eIII ist bereits vollständig von den ET abgegeben. (E, F) Späteres Stadium. Die medianen Zellen haben sich geteilt. Die rechte Körperhälfte zeigt in der Entwicklung einen leichten Vorsprung. (G, H) Die Reihen E(2) und E(3) haben sich vollständig geteilt. Die ET haben noch nicht mit der Abgabe der Reihe eIV begonnen.

Die erste Teilung der Reihe eI und der Verlauf der folgenden Teilungen der ET-Derivate bei *Porcellio scaber*

Die Teilung der ersten ET-Derivatreihe beginnt kurz bevor die Reihe eIV von den ET abgegeben wird und nachdem sich die Reihen E(2) und E(3) bereits geteilt haben (Abb. 8). Die Reihenfolge der Zellteilungen der Reihe eI verläuft noch nicht in einer strikt von innen nach außen ablaufenden Teilungswelle. Die Reihenfolge der Teilungen in Aufnahme 3 verläuft wie in Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 4: Teilungsabfolge und Zeitpunkt der Reihe eI aus Aufnahme 3.

Zelle	eI ₅ r	eI ₄ r	eI ₃ r	eI ₂ r	eI ₁ r	eI ₀	eI ₁ l	eI ₂ l	eI ₃ l	eI ₄ l
Abfolge	8	10	6	2	3	1	5	9	7	4
Zeitpunkt (min)	108	120	72	36	39	0	66	117	96	54

Die Teilungen der ET-Derivatereihen finden immer in einem Abstand von zwei e-Reihen zu den ET statt. Das bedeutet, dass der Zellzyklus eines ET-Derivats dreimal so lange dauert, wie der eines ET. Diese Korrelation wird während der Keimstreifbildung beibehalten. Mit der Etablierung der Teilungswellen der ET von innen nach außen ergibt sich auch eine entsprechende Regelmäßigkeit bei den Teilungen der ET-Derivate. Aus den Teilungen der ET-Derivatereihe eI entstehen die Reihen eIab und eIcd. Die Reihen, die aus den folgenden ET-Derivatereihen entstehen, werden ebenfalls mit ab und cd bezeichnet.

Teilungen der Abkömmlinge der Reihen E(2) und E(3), ab und cd bei *Porcellio scaber*

Die weiteren Teilungen der Reihen E(2) und E(3) beginnen in der Reihe E(2)ab mit einer Längsteilung. Dies erfolgt zu dem Zeitpunkt, an dem die Reihe eVII von den ET abgegeben wird. Kurz darauf beginnen die Teilungen in E(3)ab, darauf folgt

E(2)cd und E(3)cd. In den Präparaten sind in allen vier Zellreihen zeitgleich Mitosen zu erkennen, die alle in Längsrichtung stattfinden (Abb. 9).

Auch in dieser Teilungswelle sind die beiden Körperhälften in ihrem Entwicklungszustand nicht miteinander gekoppelt. Ist eine Körperhälfte im Rückstand, betrifft dies alle Reihen innerhalb dieser Körperhälfte. Zu diesem Zeitpunkt beginnen auch die beiden Reihen der ET-Derivate eIab und eIcd mit ihren Zellteilungen zu den Reihen a, b, c und d.

Diese Teilungen in den Reihen E(2) und E(3) erfolgen proximolateral ungeordnet. Es ist keine gerichtete Teilungswelle zu beobachten (Abb. 9). Auch hier ist es durch die vorhandene Variabilität der Zellteilungsabfolge wahrscheinlich, dass die Reihenfolge der Teilungen durch den individuellen Zellzyklus gesteuert ist. Die Reihe E(2) hat als erste die Teilungen in die Reihen a, b, c und d abgeschlossen. Darauf folgt die Reihe E(3).

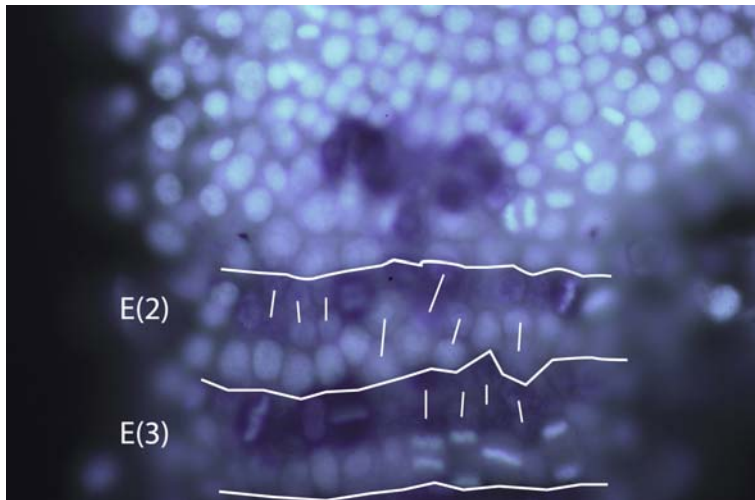


Abb. 9: **Keimstreif mit Hoechstfärbung und En Markierung** (dunkelblau). Teilungen der Reihen E(2)ab und E(2)cd, sowie E(3)ab und E(3) cd. In den Reihen E(2)ab und E(3)ab sind alle Zellen En positiv.

Die Teilungen in Reihe E(1) bei *Porcellio scaber*

Die Teilungen in der Reihe E(1) wurden anhand von Keimstreifpräparaten rekonstruiert, in denen En mit einer immunhistochemischen Färbung markiert wurde. Die Reihen E(2)ab und E(3)ab lassen sich anhand ihrer regelmäßigen Anordnung der Zellen und der *en* Expression deutlich erkennen.

Aufgrund des oben beschriebenen Teilungsmusters der Abkömmlinge der Reihe A, die sich in die Reihe E(1) anordnen, ist im medianen Bereich eine klare Zuordnung der Zellen in eine Reihe nicht möglich (Abb. 7). Dennoch ist ein Muster in den lateralen Zellen zu erkennen, in dem eine posteriore innere Zelle der Reihe

E(1) nach anterior verschoben ist (Abb. 11A). Dies ist die Zelle E(1)₁. Die lateral davon liegenden Zellen bilden eine Doppelreihe.

Aufgrund der Einsortierung von Zellen in die Reihen, die offensichtlich keinem determinierten Muster folgt, ist eine Definition der Reihe E(1) notwendig. Nimmt man die Expression des Gens *en* in Reihe E(2)ab als Marker, so bilden die anterior dazu gelegenen Zellen die Doppelreihe E(1). Die Zellen aus Reihe E(1)ab exprimieren zunächst ebenfalls das Gen *en* (Abb. 11A). Die medianen drei Zellen können nicht eindeutig zugeordnet werden. Aus der Aufnahme 3 wird ersichtlich, dass, nachdem sich die Reihen E(2) und E(3) geteilt haben, sich zwei dieser Zellen aus dem Verband lösen und in den Keimstreif einwandern (siehe Abb. 10). Die Funktion dieser Zellen war nicht aufzuklären. Möglicherweise handelt es sich um Neuroblasten. Die Einwanderung dieser Zellen wird auch anhand der Präparate ersichtlich, in denen sich nach den Teilungen der Reihen E(2) und E(3) zunächst drei median gelegene Zellen befinden, später dieser Raum jedoch von nur einer Zelle ausgefüllt wird (Abb. 11A, C). Die Zuordnung der Zellen zu Reihe E(1) erfolgt über das festgelegte Teilungsmuster, welches in den Präparaten erkannt und rekonstruiert werden kann.

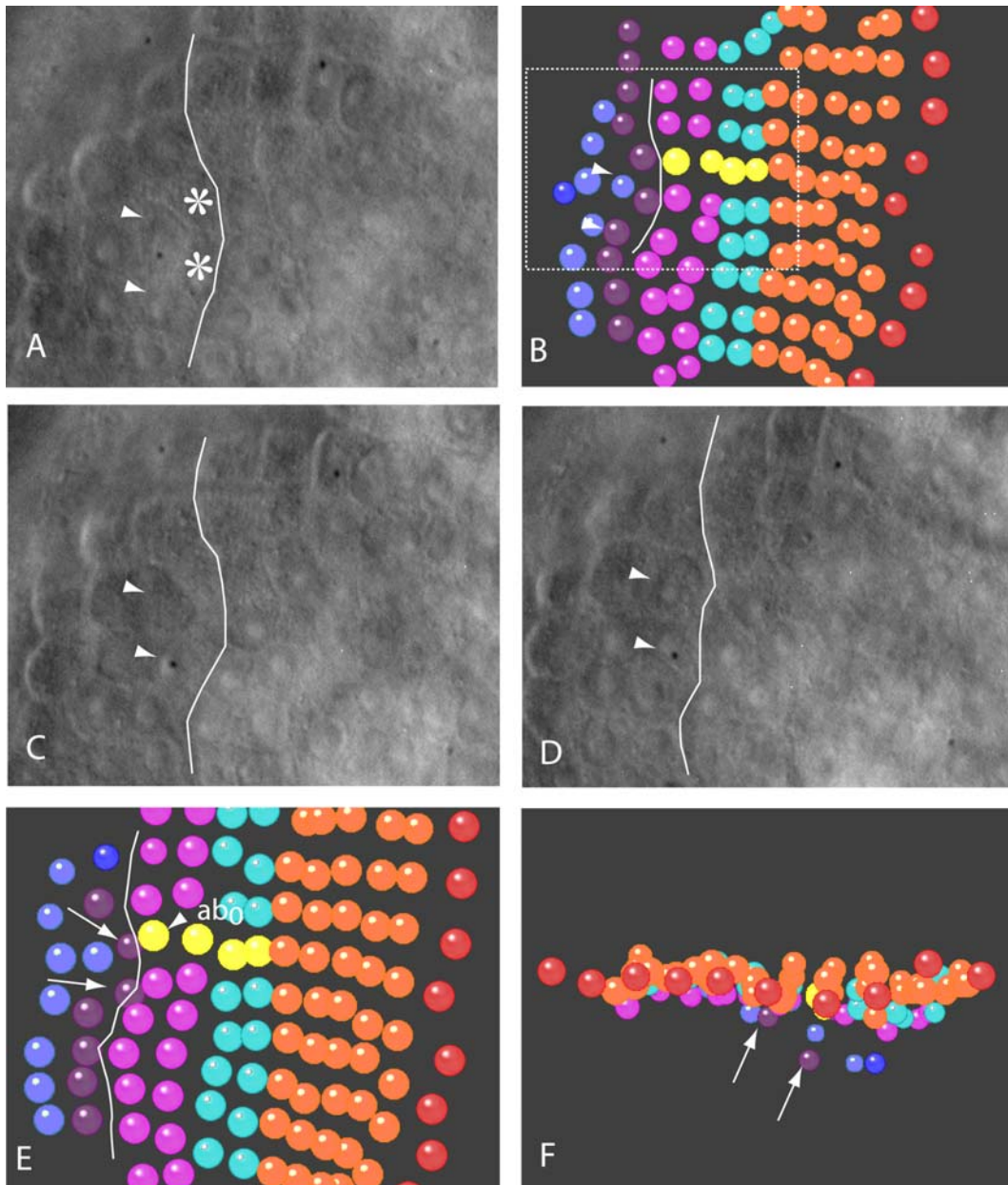


Abb. 10: **Darstellung der Einwanderung der medianen Zellen aus Aufnahme 3 bei *Porcellio scaber*.** (A) Bild vor Beginn der Einwanderung. Die Zellen, die einwandern werden, sind mit Sternchen markiert. Zur weiteren Orientierung wurden daneben liegende Zellen mit Pfeilspitzen markiert. Die Linie markiert die vordere Grenze der Reihe E(2)ab. (B) Model des Stadiums aus (A). Die gestrichelten Linien markieren den Ausschnitt, den die Originalbilder zeigen. Pfeilspitzen markieren die gleichen Zellen wie in (A). Pink: Zellen der Reihe E(2), gelb: Mittellinienzellen, violett und hellblau: hintere Abkömmlinge der Reihe A. (C, D) Die mit den Pfeilspitzen markierten Zellen rücken nach hinten und nehmen den Platz der eingewanderten Zellen ein. (E) Gleiches Stadium wie (D). Die Aufsicht zeigt die eingewanderten medianen Zellen vor E(2)ab0 und E(2)ab11 (Pfeile). (F) Die Blickrichtung von posterior nach anterior des gleichen Stadiums zeigt die beiden bereits eingewanderten Zellen (Pfeile).

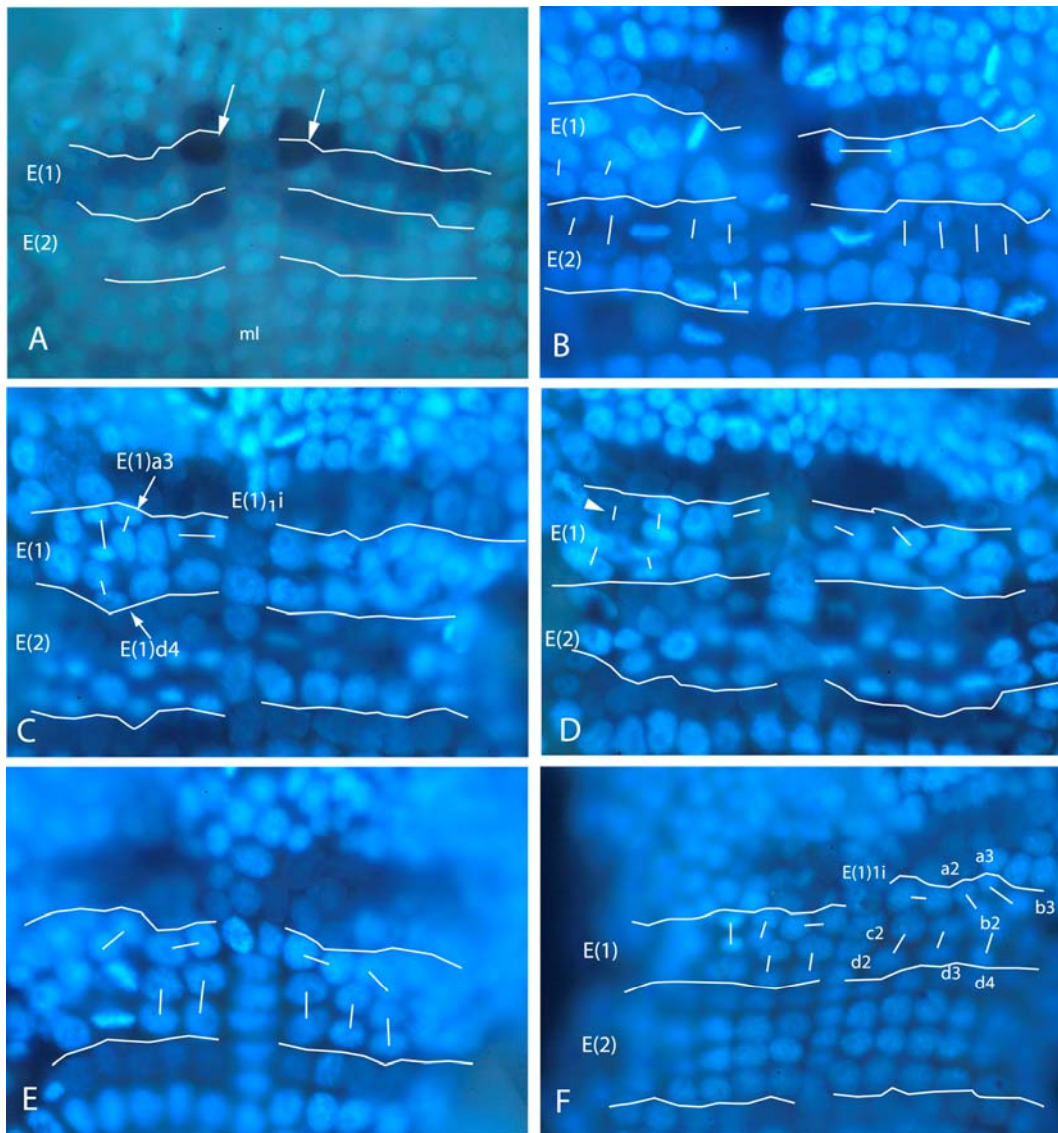


Abb. 11: Zellteilungen und Genexpression von *en* in der Reihe E(1) bei *Porcellio scaber*. Hoechstfärbung. (A) Die Zellen der Reihe E(1) bilden lateral Doppelreihen. Die Zelle E(1)₁ (Pfeil) ist nach anterior verschoben. *en* Expression ist in den dunkelblauen Zellen sichtbar. Noch exprimieren die anterioren Zellen der Reihe E(1) *en*. (B, C) Beginn der Teilungen in Reihe E(1) und E(2). Die Teilungen erfolgen nicht in einer festgelegten Reihenfolge. Die Zelle E(1)₁ teilt sich als einzige quer. Die *en* Expression breitet sich in den Zellen anterior zu E(1) nach lateral aus. (D) Die Zellen der Reihe E(1) sind weitgehend *En* negativ. Bis zu diesem Stadium können vereinzelt noch Zellen *en* exprimieren (Pfeilspitze) (E, F) Die Zellen der posterioren Reihe E(2) sind bereits gebildet. Reihe a exprimiert *en*. Vor den Zellen der Reihe E(1) hat sich ein breiter Cluster von *En* positiven Zellen gebildet.

Die Zellen der Reihe E(1) werden für die folgenden Teilungen nach Scholtz (1990) benannt, um einen besseren Vergleich zu gewährleisten.

Beim Vergleich der verschiedenen Präparate lassen sich in Bezug auf die Teilungsreihenfolge keine Regelmäßigkeiten ausmachen. Meist teilt sich die Zelle E(1)₁ zuerst quer in die Zellen E(1)_{1i} und E(1)_{1e} (Abb. 11B, C, D). Die darunter liegenden Zellen E(1)cd₂ und E(1)cd₃ teilen sich in Längsrichtung (Abb. 11E, F). Die Tochterzellen werden entsprechend als E(1)c₂ und E(1)d₂ und E(1)c₃ sowie E(1)d₃ bezeichnet. Die benachbarte Zelle cd₄ teilt sich ebenfalls in Längsrichtung in die

Zellen c_4 und d_4 . Die Mitosespindel der Zelle ab_2 ist zunächst um 45° zur Körpermitte geneigt, die Tochterzellen a_2 und b_2 werden sich jedoch später anterioposterior ausrichten (Abb. 11). Die Zelle ab_3 teilt sich ebenfalls in Längsrichtung, wobei hier in einigen Präparaten ebenfalls die Spindel um 45° nach innen geneigt ist. Das Resultat aus diesen Teilungen sind vier Reihen von Zellen, wobei hier die erste Zelle aus dem Rahmen fällt. Die vier Reihen werden von nun an als a, b, c, und d bezeichnet.

Die weiteren Teilungen der Reihe E(1) bei *Porcellio scaber*

Die Zellen $E(1)_1i$ und $E(1)_1e$ teilen sich beide in Längsrichtung und bilden die Tochterzellen $E(1)_1iv$ und $E(1)_1ih$ und $E(1)_1ev$ und $E(1)_1eh$ (Abb. 12A). Die darunter liegenden Zellen c_2 und d_2 teilen sich quer und bilden die Zellen c_2i und c_2e , sowie d_2i und d_2e (Abb. 12C, D, E und F). Die lateral von diesen gelegenen Zellen c_3 und d_3 teilen sich ebenfalls quer in die Zellen c_3e und c_3i , sowie d_3e und d_3i . Die Zelle a_2 führt eine Teilung in Längsrichtung aus, und bildet die Zellen a_2v und a_2h (Abb. 12C). Entsprechend den weiter median gelegenen Zellen c_3 und d_3 , führen die Zellen c_4 und d_4 auch Querteilungen durch. Dabei werden die Zellen c_4i und c_4e und d_4e und d_4i gebildet. Die Zelle a_3 führt eine Längsteilung in die Zellen a_3v und a_3h aus. Als nächstes teilen sich die Abkömmlinge der Zelle $E(1)_1$ alle quer (Abb. 12E, F). Folgende Zellen bilden sich aus diesen Teilungen: $E(1)_1ivi$, $E(1)_1ive$, $E(1)_1ihi$, $E(1)_1ihe$, $E(1)_1ehi$, $E(1)_1ehe$ und $E(1)_1evi$ und $E(1)_1ehe$.

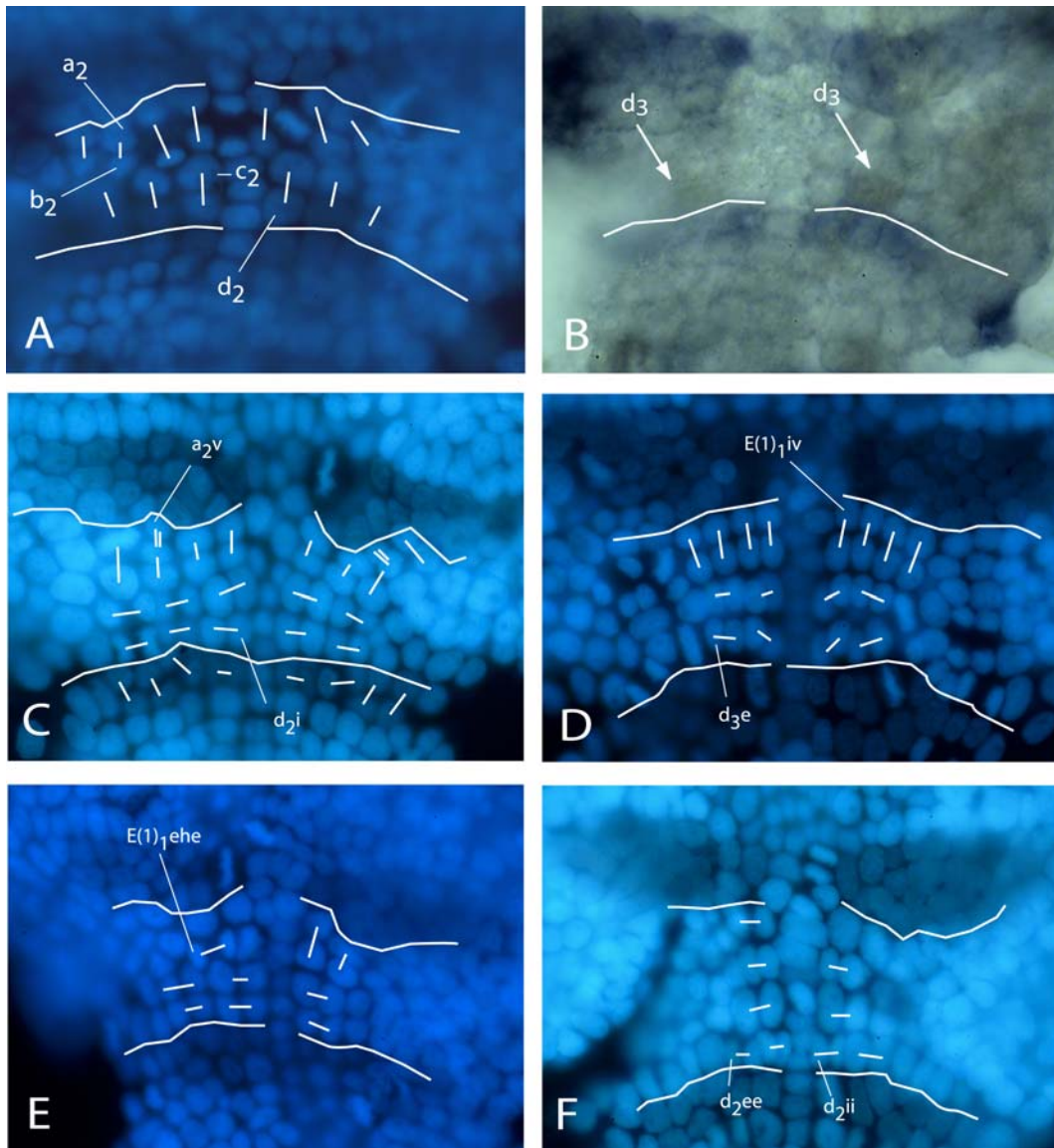



Abb. 12: **Differentielle Teilungen in der Reihe E(1) in präparierten Keimstreifen von *Porcellio scaber*.** Reihe E(1) ist durch Linien eingegrenzt. (B) Doppelmarkierung der Genprodukte En (blau) und Dll (braun), sonst Hoechstfärbungen mit Markierung von En (dunkelblau). (A) Beginn der Teilungen in den inneren Zellen E(1)i und E(1)e. (B) Gleiches Stadium wie (A). Beginn der *Dll* Expression in Zelle d_3 (Pfeile). (C, D, E und F) Weitere Querteilungen in den restlichen Zellen. Benennung der Zellen in den Abbildungen. Die Zellteilungen folgen keiner festgelegten Reihenfolge.

Die differentiellen Teilungen in den Reihen ektoteloblastischen Ursprungs bei *Porcellio scaber*

Die differentiellen Teilungen der Zellen im 4. Thoraxsegment von *Porcellio scaber*, sind mit dem 4D-Mikroskop aufgenommen worden (Aufnahme 4  Aufnahme4.avi). Da erstmalig die Zellteilungen zugleich mit den morphologischen Veränderungen direkt beobachtet werden konnten, soll das Zellteilungsmuster beschrieben werden, um dies mit den Ergebnissen von Vehling (1994) vergleichen zu können. Die Ergebnisse der

zeitlichen Analyse sind in Tab. 5 aufgeführt. Die Reihenfolge der Teilungen, sowie die Dauer des Zellzyklus zwischen erster und zweiter differentieller Teilung konnten errechnet werden. Die Positionen der Zellen nach der ersten differentiellen Teilung sind in Abb. 13B abgebildet. Die weiteren Teilungen der zweiten differentiellen Teilung konnten aufgrund der Morphogenese der Ganglienanlagen, Beine und der Intersegmentalfurche nicht weiter beobachtet werden. Der Verlauf der Teilungen in der Aufnahme wird nachfolgend beschrieben.

Der Verlauf der ersten differentiellen Teilung bei *Porcellio scaber*

Als erste Zelle teilt sich die Zelle d_1 . Die Spindel ist leicht nach außen geneigt und aus ihr entstehen die Zellen d_{1v} und d_{1h} . Beide Tochterzellen sind gleich groß und ordnen sich hintereinander an. Kurz darauf beginnt die Zelle b_2 mit einer Längsteilung. Die Nachbarzelle b_1 schließt sich an. In den weit lateral gelegenen Zellen b_8 und a_7 findet schon jetzt eine Teilung statt. Nach der Längsteilung von Zelle c_1 folgen die Zellen b_7 und b_3 .

Als nächste Zelle teilt sich d_2 quer in die Zellen d_{2i} und d_{2e} . Darauf folgt die Zelle d_4 mit einer Querteilung in die Zellen d_{4i} und d_{4e} . Die Zelle d_3 teilt sich ebenfalls quer in die Zellen d_{3i} und d_{3e} . Ungefähr 6 min nach dieser Teilung senkt sich die Zelle d_{3i} gegenüber ihrer Schwesterzelle d_{3e} ab. Die sechs Tochterzellen der beiden letzten Teilungen sind seitlich abgeflacht, da der Keimstreif sich bei diesen Teilungen nicht lateral ausdehnt. Ungefähr zeitgleich mit Zelle d_2 teilt sich die davor gelegene Zelle c_2 . Hierbei ist zum ersten Mal eine inäquale Teilung zu beobachten, deren Teilungswinkel zudem noch 45° nach außen geneigt ist. Die resultierende Zelle c_{2v} ist kleiner als die Zelle c_{2h} . Die lateral gelegenen Zellen c_3 , c_4 und c_5 teilen sich in Längsrichtung. Die Zelle c_3 führt hierbei eine leicht inäquale Teilung durch, aus der eine kleinere vordere Zelle c_{3v} entsteht.

Die Reihe a beginnt als letzte Reihe mit ihren differentiellen Teilungen. Diese beginnen in Zelle a_1 mit einer Querteilung ungefähr zu dem Zeitpunkt, an dem sich die Zellen d_2 und b_2 teilen. Als nächste teilt sich die Zelle a_3 und dann a_2 . In Reihe a teilen sich a_4 , a_5 und a_6 in Längsrichtung. Die Zelle a_5 ist die letzte Zelle ihrer Reihe, die die differentielle Teilung vollzieht. Da die Zellteilungen in allen Reihen sowohl innen als auch außen beginnen, ist es entweder die 5. oder die 6. Zelle, die sich als letzte ihrer Reihe teilt. Eine eindeutige von innen nach außen gerichtete Teilungswelle ist bei den differentiellen Teilungen nicht vorhanden. Die ersten

differentiellen Teilungen sind im aufgenommenen Embryo (Aufnahme 4) nach circa 9,5 h abgeschlossen. Zehn Minuten nach der letzten Teilung beginnen die zweiten differentiellen Teilungen (Tab. 5).

Der Verlauf der zweiten differentiellen Teilung bei *Porcellio scaber*

Die zweiten differentiellen Teilungen bei *Porcellio scaber* beginnen erst, wenn alle Zellen die erste differentielle Teilung vollzogen haben (Tab. 5 und Abb. 13). Die erste Zelle, die ihre zweite differentielle Teilung durchführt, ist die Zelle d_1h . Diese Zelle gibt eine kleine Zelle nach unten ab, die mit d_1hg bezeichnet wird. Diese Zelle ist eine Ganglionmutterzelle. Die im ektodermalen Zellverbund gebliebene Zelle d_1hn , ist wesentlich größer. Der Zellzyklus dauerte bei dieser Zelle 9,5 h (Zeitraum zwischen Geburt und erster Teilung). Die nächste Zelle, die sich teilt, ist die Zelle c_2h . Sie führt eine Querteilung durch und gibt wieder die wesentlich kleinere Zelle c_2he nach lateral ab, die größere Schwesterzelle ist c_2hi . Der Zellzyklus der Zelle c_2h betrug 8,2 h. Die nächste Teilung findet in Reihe b statt. Hier teilt sich zuerst die Zelle b_2h quer. Aus dieser äqualen Teilung entstehen die Zellen b_2he und b_2hi . Die Zelle d_2i folgt mit einer Querteilung in die Zellen d_2ii und d_2ie . Diese beiden Tochterzellen sind wie ihre Mutterzelle seitlich abgeflacht.

Die Zelle b_1v teilt sich quer in die Zellen b_1ve und b_1vi . Die Zelle d_2e führt eine Querteilung durch, aus der die beiden seitlich abgeflachten Zellen d_2ee und d_2ei entstehen. Kurz darauf teilt sich die Zelle b_2v ebenfalls quer. Die Tochterzelle b_2ve ist etwas kleiner als die Zelle b_2vi . Die darauffolgende differentielle Teilung führt zur Bildung einer Ganglionmutterzelle, die nach unten abgegeben wird. Diese Teilung wird von der Zelle b_1v vollzogen. Es entstehen die Zellen b_1vg und b_1vn . Nach dieser Teilung beginnt die Reihe a mit der ersten Mitose in der innen gelegenen Zelle a_1i . Sie führt eine Querteilung in die Zellen a_1ii und a_1ie durch. Die Zelle d_4e der sich bereits aufwölbenden Beinknospe teilt sich quer in die Zellen d_4ee und d_4ei . Etwa zeitgleich folgen die Zellen c_1v und c_1h , welche sich beide quer in die Zellen c_1ve und c_1vi , sowie c_1he und c_1hi teilen. Zu diesem Zeitpunkt teilt sich ebenfalls die Zelle b_3h längs in die Zellen b_3hh und b_3hv .

Die sich an der Beinspitze befindende Zelle d_3e führt die nächste differentielle Teilung aus. Sie teilt sich abermals quer in die Zellen d_3ee und d_3ei . Die Nachbarzelle d_4i folgt ebenfalls mit einer Querteilung in die Zellen d_4ii und d_4ie . Die Spindel der sich als nächstes teilenden Zelle b_4h ist leicht nach außen geneigt. Sie teilt sich äqual

in die Zellen b_4hv und b_4hh . Die Zelle a_1e folgt mit einer Querteilung in die Zellen a_{1ee} und a_{1ei} . Die sich am inneren Rand der Beinknospe befindende Zelle d_3i teilt sich quer in die Zellen d_{3ii} und d_{3ie} . Die Tochterzellen bilden die Verbindung zwischen Beinspitze und Bauchseite. Die den posterioren Rand des anterioren Beines bildende Zelle a_3v teilt sich in Längsrichtung in die Zellen a_{3vv} und a_{3vh} . Darauf folgt die Zelle b_4v , die sich in Längsrichtung in die Zellen b_{4vv} und b_{4vh} teilt. Diese Zellen bilden den posterioren Rand des anterioren Segmentes. Die auffällig kleine Tochterzelle aus der Teilung von b_2 , b_{2v} teilt sich nun äqual und längs. Es entstehen dadurch die Zellen b_{2vv} und b_{2vh} . Der Zellzyklus dieser Zelle beträgt fast 15 h und ist somit der längste der gesamten differentiellen Teilungen. Die Zelle a_2e teilt sich als nächste Zelle in Längsrichtung in die Zellen a_{2ev} und a_{2eh} .

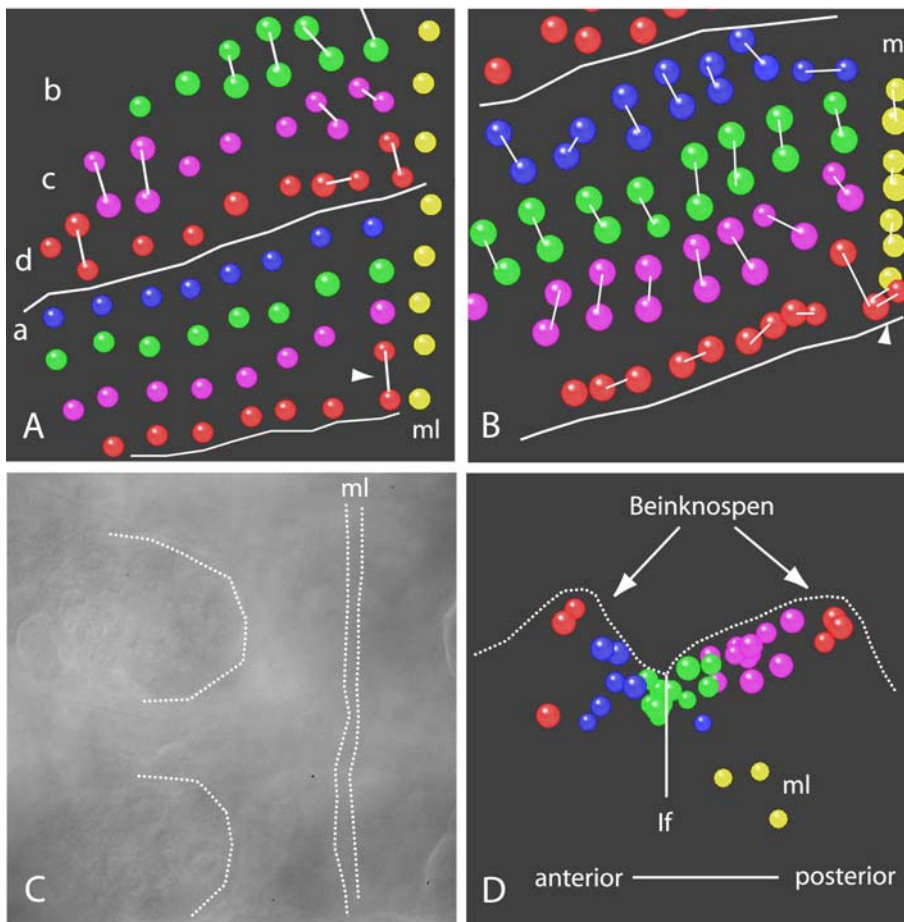


Abb. 13: **Verlauf der ersten und zweiten differentiellen Teilung aus Aufnahme 4 in der rechten Körperhälfte von *Porcellio scaber*.** (A) Beginn der ersten differentiellen Teilung im hinteren Segment mit der Mitose von d_1 (Pfeilspitze). Schwesterzellen sind mit Balken verbunden. Zellen der Mittellinie (ml) sind gelb. (B) Beginn der zweiten differentiellen Teilung in d_{1h} (Pfeilspitze). Das Modell zeigt die Lage der Zellen im Keimstreif. (C) Beinknospen der linken Körperhälfte (mit gestrichelten Linien umrandet). (D) Gleiches Stadium wie (C). Blick von lateral auf den Keimstreif. Die Zellen der Reihe d (rot) bilden die Beinspitzen. Die Mittellinienzellen (gelb) haben sich gegenüber den anderen Zellen abgesenkt. Die Intersegmentalfurche (If) wird zwischen den vorderen und hinteren Abkömmlingen der Reihe b gebildet.

Tab. 5: Zeitlicher Verlauf der ersten und zweiten differentiellen Teilung im 4. Thoraxsegment (Aufnahme 4)

Reihenfolge	Zelle erste diff. Teilung	Zeitpunkt (min)	Zelle zweite diff. Teilung	Zeitpunkt (min)	Zellzyklus (h)
1	d ₁	0	d ₁ h	575	9,5
2	b ₂	28	d ₁ v	600	10
3	b ₁	55	c ₂ h	655	8,2
4	b ₈	103	b ₂ h	673	10,7
5	a ₇	105	d ₂ i	685	8,7
6	c ₁	130	b ₁ v	698	10,7
7	b ₇	138	d ₂ e	718	8,9
8	b ₃	143	b ₂ v	730	11,7
9	c ₂	158	b ₁ h	768	11,9
10	d ₂	163	a ₁ i	773	9,9
11	d ₈	170	d ₄ e	793	8,8
12	a ₁	180	c ₁ h	808	11,3
13	a ₈	191	c ₁ v	808	11,3
14	b ₄	210	b ₃ h	813	12,6
15	c ₈	253	b ₃ v	868	13,5
16	d ₄	261	d ₃ e	888	10,1
17	b ₅	265	d ₄ i	900	10,6
18	d ₃	283	b ₄ h	928	12
19	b ₆	288	a ₁ e	960	13
20	c ₇	293	d ₃ i	985	11,8
21	c ₃	325	a ₃ v	990	9,3
22	c ₄	368	b ₄ v	1008	13,3
23	c ₆	380	c ₂ v	1055	14,9
24	a ₃	433	a ₂ e	1066	9,5
25	d ₅	440			
26	c ₅	473			
27	a ₂	495			
28	a ₄	515			
29	a ₆	540			
30	a ₅	565			

Analyse der Dauer der Zellzyklen bei *Porcellio scaber* von Zellen unterschiedlicher Stadien und Typen

Die 4D-Mikroskopie erlaubt bei *Porcellio scaber* die Feststellung des exakten Zeitpunktes einer Mitose. Wurden bei längeren Aufnahmen zwei Zellteilungen erfasst, lässt sich aus den Mitosezeitpunkten die Dauer des jeweiligen Zellteilungszyklus errechnen. In Tab. 6 sind die Zelltypen aufgelistet, bei denen die Zellzyklusdauer festgestellt werden konnte. Bis auf die Zellen der differentiellen Teilungen ist die Abweichung der individuellen Zellzyklen vernachlässigbar. Der individuelle Zellzyklus der Zellen, die sich differentiell teilen ist in Tab. 5 aufgeführt.

Bezüglich der Zellzyklusdauer ist die Tendenz zur fortschreitenden Verkürzung zu beobachten. Zellen der Keimscheibe im Gastrulationsstadium benötigen ungefähr einen Tag, um sich zu teilen. Sobald sich die ET ausdifferenziert haben, reduziert sich ihr Zellzyklus auf ungefähr 10 h. Im weiteren Verlauf der Entwicklung benötigen die ET lediglich etwas mehr als 6,5 h zwischen der Abgabe ihrer Derivate. Der Zellzyklus der Derivate verlängert sich nach ihrer Bildung auf das dreifache ihrer Mutterzelle (Tab. 6). Auch ihr Zellzyklus verkürzt sich um den gleichen Faktor wie der der ET. Die Zellen, die die Reihen vor den ET-Derivaten bilden, teilen sich zunächst fast zeitgleich, die folgende Teilung verzögert sich aber in den posterioren Abkömmlingen (Reihe B). Dies drückt sich in der kürzeren Zellzyklusdauer der Zellen aus Reihe A gegenüber der der Zellen aus Reihe B aus (Tab. 6). Beobachtet man bis zu diesem Stadium eine Regelmäßigkeit der Zellzyklusdauer innerhalb der Zelltypen, divergiert der Zellzyklus der Zellen aus den Reihen a, b, c und d während der differentiellen Teilungen und bewirkt dadurch die charakteristische Abfolge der Zellteilungen (Tab. 6).

Tab. 6: Durchschnittliche Dauer der Zellzyklen aufgelistet nach Zelltyp und Stadium (n = Anzahl der Messungen)

Zelltyp	Keimscheibenzellen während der Gastrulation	ET zwischen eI und eII Abgabe	ET zwischen eII und eIII Abgabe	ET zwischen eIII und eIV Abgabe
Dauer des Zellzyklus in h	24,1 (n = 3)	9,7 (n = 3)	6,7 (n = 8)	6,4 (n = 9)
Zelltyp	Zellen Reihe A- A1Zellen Reihe A- A2	Zellen Reihe B-B1	ET-Derivate	erste – zweite differentielle Teilung
Dauer des Zellzyklus in h	12,9 12,5 (n = 10)	18,3 (n = 4)	19,2 (errechnet sich aus der dreifachen ET- Zyklus Dauer)	10,9 (n = 24)

3.2 Die Genexpression von *en* und *Dll* im postnauplialen Keimstreif von *Porcellio scaber*

Der Verlauf der *en* Expression im Keimstreif von *Porcellio scaber*

Neben der Verwendung der En Markierung als Marker der anterioren Reihen zur Orientierung im Keimstreif, wurde das Expressionsmuster von *en* analysiert. Der verwendete Antikörper Mab4D9 detektiert die Genprodukte der paralogen *en*-Gene *en-1* und *en-2* von *Porcellio scaber* (Abzhanov und Kaufman 2000). Das Expressionsmuster von *en* lässt sich nur mit der Verwendung der Keimstreifpräparate verfolgen. Dies erschwert die Identifizierung der Zellen in Bereichen, in denen Zellwanderungen und Zellsortierungen vorkommen, wie im Bereich der Abkömmlinge von Reihe A.

Bei *Porcellio scaber* befinden sich die ersten Zellen die *en* exprimieren neben den median gelegenen Abkömmlingen der Reihe A2 (Abb. 14A). Die Reihe besteht aus einer Doppelreihe, deren Zellen sich zur Reihe E(1) anordnen werden. Drei Zellen befinden sich zwischen den En positiven Zellen. Auf die Benennung der Zellen wird zunächst verzichtet, da eine Identifizierung aufgrund der möglichen Zellverschiebungen und Zelleinwanderungen nicht durchgeführt werden kann (Abb. 6, Abb. 10). Die Expression beginnt in beiden Körperhälften in einer Zelle. Die

anterior angrenzende Zelle fängt kurze Zeit später ebenfalls an, *en* zu exprimieren (Abb. 14B, C).

Die Expression weitet sich nach lateral aus. Kurze Zeit später befinden sich nicht mehr drei Zellen zwischen den En positiven Zellen, sondern nur noch eine (Abb. 11A). Dies liegt daran, dass aus dieser Reihe zwei Zellen in den Keimstreif immigrieren, wie in Aufnahme 3 zu sehen ist (Abb. 10). Die lateralen Nachbarzellen der En positiven Zellen beginnen ebenfalls mit der *en* Expression. In einigen Präparaten beginnen auch weiter anterior gelegene Zellen mit der *en* Expression. Die Unterschiede des Expressionsmusters in den Präparaten sind gross. In einigen bleibt der Bereich der *en* exprimierenden Zellen zunächst klein (Abb. 9), in anderen weitet sich dieser Bereich nach lateral aus (Abb. 11).

Welche Zellen in diesem Bereich *en* exprimieren, ist bei *Porcellio scaber* nicht in jedem Embryo gleich. In einigen Präparaten ist dieses Feld nur fünf Zellen pro Körperhälfte groß, in anderen Präparaten kann es bis an den Rand des Keimstreifs reichen. Auch können Zellen der posterior zu diesem Feld liegenden Reihe E(1) vereinzelt *en* exprimieren. In manchen Präparaten behalten diese Zellen die *en* Expression bis zu den differentiellen Teilungen bei (Abb. 11D). Später jedoch ist in keiner der Zellen von E(1) En nachweisbar (Abb. 11 und Abb. 12). In der Mittellinie schließt sich die Trennung der beiden Felder von *en* exprimierenden Zellen. Statt den drei En negativen Zellen befindet sich später nur noch eine En positive Zelle zwischen den beiden Feldern. Dies korreliert zeitlich mit der in der Aufnahme beobachteten Einwanderung von zwei medianen Zellen in diesem Bereich.

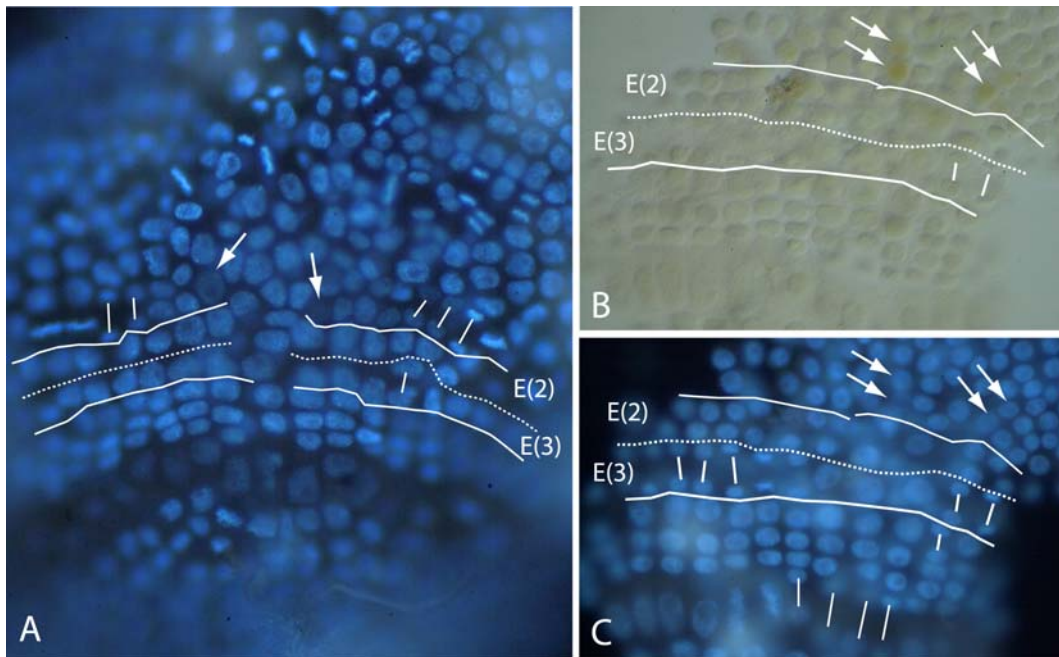


Abb. 14: **Beginn der *en* Expression im Keimstreif von *Porcellio scaber*.** (A) Hoechstfärbung. Die Reihen E(2) und E(3) sind kurz vor der Teilung. Die Reihe eIII ist bereits von den ET abgegeben. Direkt vor der inneren Zelle von E(2) befinden sich zwei En positive Zellen (Pfeile). (B) Abbildung des Keimstreifs im späteren Stadium, DIC. En braun markiert. Die Reihen E(2) und E(3) haben sich bereits einmal geteilt. (C) Gleiches Präparat wie (B), Hoechstfärbung. Die ET-Derivate eI beginnen mit der Teilung, Reihe eIV wird von den ET abgegeben. Anteriore Abkömmlinge der hinteren Abkömmlinge der Reihe A2 (E(1)) beginnen mit der *en* Expression (Pfeile). Zwischen den En positiven Zellen sind drei Zellen zu erkennen.

Hinter der Reihe E(1) beginnen die Zellen der Reihe E(2)ab mit der *en* Expression (Abb. 11A). In allen gefärbten Präparaten sind die Zellen der Mittellinie zwischen den Zellen des vorderen Feldes und der Reihe E(2)ab zumindest schwach En positiv. Es ist möglich, dass die Expression in dieser Zelle für den Start der *en* Expression in Reihe E(2)ab notwendig ist. Die lateralen Zellen der Reihe E(2) beginnen ebenfalls mit der *en* Expression, wobei die En positiven Zellen immer in Kontakt stehen und keine Zelle weiter lateral autonom mit der *en* Expression beginnt (Abb. 11).

Während dieser Ausbreitung beginnt die weiter posterior gelegene Reihe E(3)ab mit der *en* Expression in der Zelle E(3)₀. Diese *en* Expression weitet sich lateral aus, während die ET-Derivatreihe eV abgegeben wird. Dieser Verlauf der Expression setzt sich in den Reihen der ET-Abkömmlinge eIab und eIIab fort (Abb. 15). Die *en* Expression beginnt in den ab-Reihen zu dem Zeitpunkt, an dem die fünfte posterior gelegene e-Reihe abgegeben wird (in diesem Fall Reihe eVI).

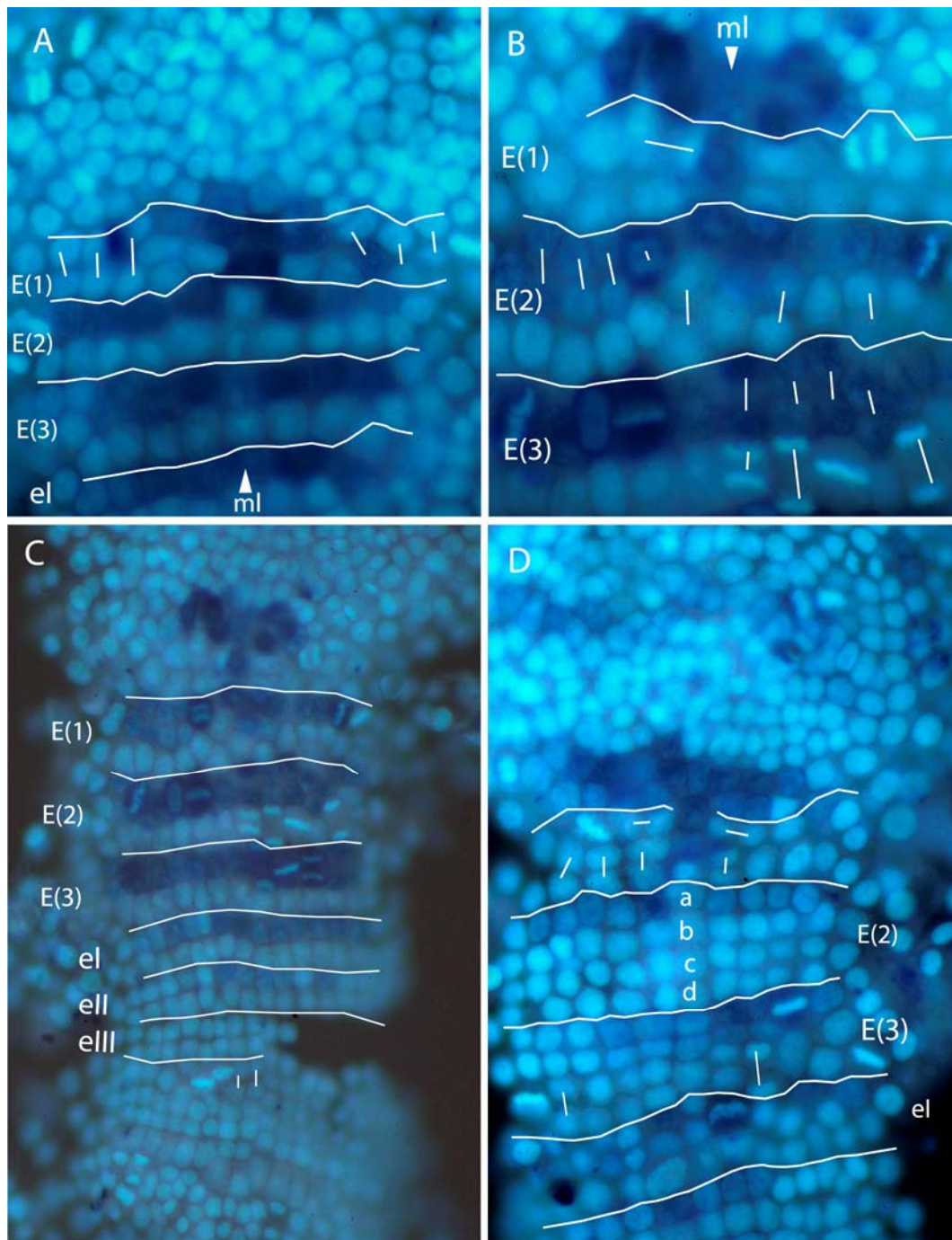


Abb. 15: **Expression des Gens *en* während der zweiten Teilung der Reihen bei *Porcellio scaber*.** Hoechstfärbung. (A) *en* positive Zellen in den Reihen ab der Reihe E(2), E(3) und el. Vor der Reihe E(2)ab ist das Muster unregelmässig. Die dritte Zelle der rechten Körperhälfte ist noch *en* positiv. (B) Nach der Teilung der Zellen aus den Reihen ab bleiben die Tochterzellen zunächst *en* positiv. (C) Gleiches Präparat wie (B). In den hinteren Reihen beginnt die *en* Expression median und weitet sich nach lateral aus. Die rechte Körperhälfte liegt in der Entwicklung gegenüber der linken etwas zurück. Zellen der Reihe ellab exprimieren *en*. (D) Anderes Präparat. Die Reihen a, b, c und d von E(2) haben sich bereits gebildet. Die Zellen der Reihe b verlieren die *en* Expression. Die Zellen der Reihe ellab exprimieren *en*.

Wenn sich die Reihen E(2)ab und E(3)ab, sowie elab teilen, ist in den Tochterzellen der Reihe b *En* vorerst nachweisbar, diese schalten die *en* Expression jedoch kurz darauf wieder ab, so dass nur in den Zellen der Reihe a *En* nachweisbar ist (Abb. 15B, C ,D).

In den hinteren e-Reihen, deren Teilungen von innen nach außen in einer Teilungswelle ablaufen, verläuft die *en* Expression pro genealogische Einheit, welche von den ET abstammt, wie folgt:

Die Zellen der Mittellinie beginnen mit den inneren lateralen Zellen der Reihe ab die Expression von *en*. Dies erfolgt noch zu einem Zeitpunkt, in dem sich weder die Reihe ab noch die Reihe cd geteilt hat (Abb. 15C). Die Expression weitet sich auf beiden Seiten nach lateral aus. Dies muss auf beiden Seiten nicht gleichzeitig geschehen, sondern richtet sich hauptsächlich nach dem Entwicklungsstadium der jeweiligen Körperhälfte. Während die lateralen Zellen der Reihe ab die *en* Expression übernehmen, beginnen die inneren Zellen mit den Mitosen. Die Tochterzellen sind zunächst En positiv, beenden jedoch später ihre *en* Expression wieder (Abb. 16A, B). Der Verlust der *en* Expression erfolgt nach drei bis vier Zellteilungen der Teilungswelle: in Zelle b₁ ist En nicht mehr nachweisbar, nachdem sich die Zelle b₄ oder b₅ geteilt hat. Während dieses Prozesses ist in den folgenden zwei genealogischen Einheiten die *en* Expression in den Reihen ab nachweisbar.

Resultat dieses Verlaufs ist die *en* Expression in den Zellen der Reihe a, während die anderen Zellen der genealogischen Einheit b, c und d En negativ sind (Abb. 16A, B).

Der Verlauf der *en* Expression während der differentiellen Teilungen bei *Porcellio scaber*

In einer genealogischen Einheit, welche ektoteloblastischer Herkunft ist, und bei jener Einheit, die aus den Reihen E(2) und E(3) entstanden ist, exprimieren alle Zellen der Reihe a *en* bevor die differentiellen Teilungen beginnen. Während der Vergrößerung des Bereichs En positiver Zellen sind zwei unterschiedliche Vorgänge zu beobachten: einerseits die Übernahme der *en* Expression von an En positiven Zellen angrenzenden Zellen, andererseits Zellteilungen En positiver Zellen, wobei die Tochterzellen *en* weiterhin exprimieren (Abb. 16).

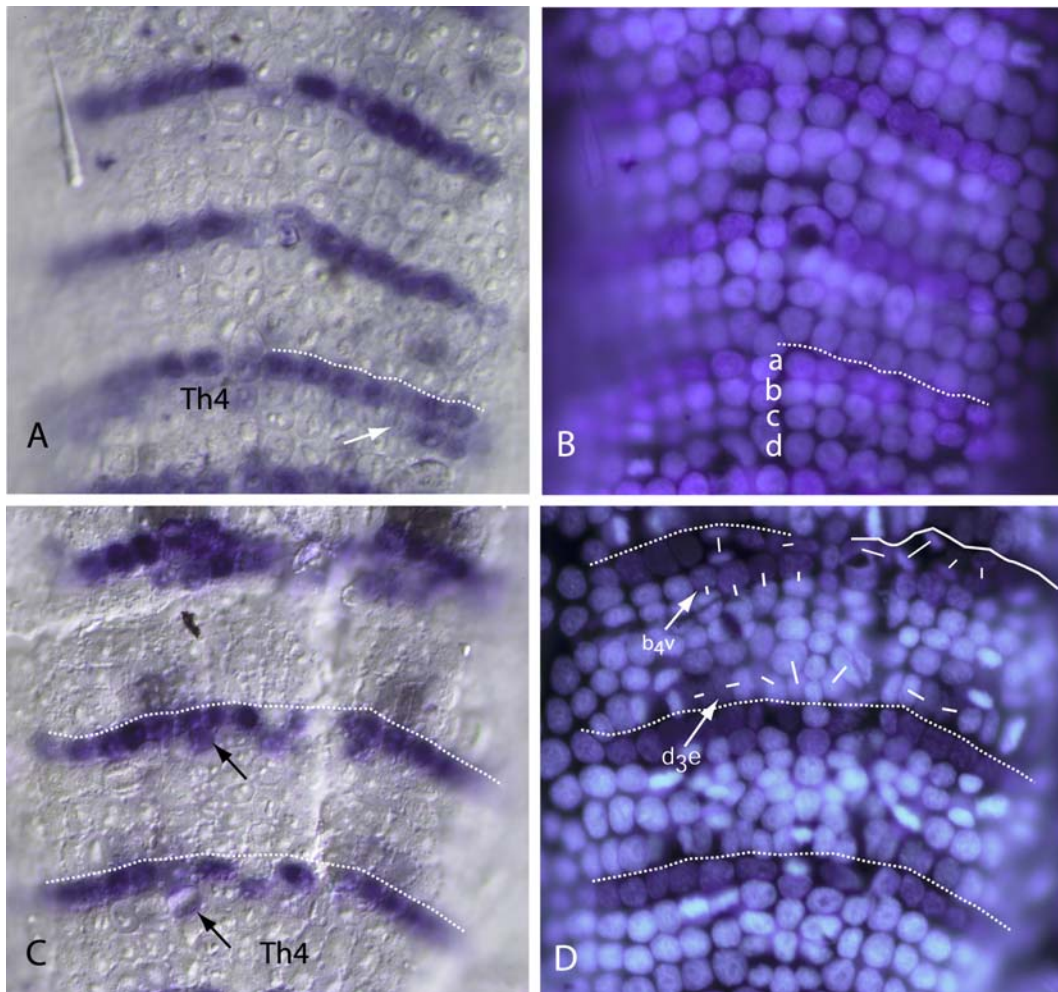


Abb. 16: **Verlauf der *en* Expression bei *Porcellio scaber* während der differentiellen Teilung.** (A) DIC. Nach der Teilung von Reihe ab bleiben die Zellen der Reihe b zunächst *en* positiv, verlieren später die Expression wieder. Die Zelle b_{5r} (Pfeil) würde die Expression als nächste verlieren. (B) Hoechstfärbung. Gleiches Präparat wie (A). Die Teilungswelle von cd ist noch nicht abgeschlossen. (C, D) Späteres Stadium. Links DIC mit Doppelmarkierung von *en* (blau) und *DII* (braun), rechts Hoechstfärbung. Zellen der Reihe b haben die Expression von *en* bereits wieder aufgenommen. In Zelle b_2 (Pfeil unten) ist bereits während der Metaphase *en* nachweisbar. Im vorderen Segment ist nur noch die Tochterzelle b_{2v} *en* positiv (Pfeil). In einem Segment weiter vorne ist die Entwicklung noch weiter fortgeschritten. Die vier inneren Zellen der Reihe b_{2v} exprimieren *en*. Die Zellen aus Reihe a bleiben nach der Teilung *en* positiv. In diesem Stadium ist in der Zelle d_{3i} *DII* nicht mehr nachweisbar (inneren Nachbarzelle von d_{3e}).

Die erste Ausweitung der *en* Expression erfolgt durch den ersten Prozess: Die vorderen Abkömmlinge der Reihe b, die an die Zellen der Reihe a angrenzen, beginnen mit der *en* Expression. Teilweise ist zu beobachten, dass *en* schon in der Mutterzelle während der Metaphase nachweisbar ist (Abb. 16C). Diese Übernahme findet zum Zeitpunkt der ersten differentiellen Teilungen der äußeren Zellen der Reihe c, c_3 , c_4 , und c_5 , sowie der darunter gelegenen Zellen d_4 und d_5 statt. Eine der inneren Zellen der Reihe b, dies kann b_{1v} oder auch b_{2v} sein, beginnt zuerst mit der *en* Expression, die sich dann nach lateral über die angrenzenden Zellen ausbreitet. Diese *en* Expression kann lateral bis zu der Zelle b_{5v} reichen. In der bereits *en*

positiven Reihe a weitet sich das Feld der *en* Expression durch Zellteilungen aus (Abb. 16C, D).

Alle Tochterzellen der ersten differentiellen Teilung in Reihe a behalten die *en* Expression bei. Es wurde kein Fall beobachtet, in dem posteriore Tochterzellen der Reihe b *en* exprimieren. Während der zweiten differentiellen Teilung breitet sich die *en* Expression in Reihe b aus, indem die Tochterzellen die Expression beibehalten. Die posterior gelegenen Abkömmlinge der Reihe b bilden später den posterioren Teil der Intersegmentalfurche (Abb. 13C). Die vorderen Abkömmlinge der Zellen a_2 und a_3 bilden vorwiegend den Hinterrand des entstehenden Beines.

Die Expression des Gens *Dll* im Keimstreif von *Porcellio scaber*

Mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers gegen *Dll* (Panganiban et al. 1995) wurde die Expression des Gens im Keimstreif der beiden untersuchten Arten *Porcellio scaber* und *Orchestia cavimana* nachgewiesen. Dem Homeobox-Protein wird als Genregulator eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Extremitäten bei Arthropoden zugeschrieben (Panganiban et al. 1995; Panganiban et al. 1997; Popadic et al. 1998; Scholtz et al. 1998; Williams 1998; Nulsen und Nagy 1999; Olesen et al. 2001; Williams et al. 2001). Experimentelle Studien an der Taufliege *Drosophila* und der Spinne *Cupiennius* konnten dies bestätigen (Cohen et al. 1989; Schoppmeier und Damen 2001). Das Expressionsmuster von *Porcellio scaber* und *Orchestia cavimana* konnte mit einer zellulären Auflösung analysiert werden. Der Beginn und Verlauf der *Dll* Expression bei *Porcellio scaber* soll zunächst beschrieben werden.

Die *Dll* Expression beginnt in jedem Segment des postnauplialen Keimstreifs in der Zelle d_3 (Abb. 12B, Abb. 17A, B). Dies trifft sowohl für die Reihe E(1) als auch für die restlichen Reihen des postnauplialen Keimstreifs zu. Der Verlauf der *Dll* Expression soll zunächst für die Segmente ektoteloblastischen Ursprungs behandelt werden. Dabei wird auf Unterschiede der pleonalen zu den thorakalen Segmenten separat eingegangen. Anschließend folgt eine Analyse des Verlaufs der *Dll* Expression in der Reihe E(1).

Die Expression des Gens *Dll* in den Reihen ektoteloblastischer Herkunft bei *Porcellio scaber*

Der Beginn der Expression von *Dll* in den Segmenten des postnauplialen Keimstreifs, die durch ET-Derivate gebildet werden, ist identisch mit dem in den

Reihen nicht-ektoteloblastischen Ursprungs. Im Verlaufe der Entwicklung erfährt das Muster jedoch extremitätentypische Abwandlungen. Das Muster divergiert später deutlich in dem Segment der 2. Maxille. Der Bereich Dll positiver Zellen bleibt hier viel kleiner als in den übrigen Segmenten. Eine andere Abwandlung gegenüber dem Muster der restlichen Thorakopoden findet man im achten Thorakopod. Dieser wird in Isopoden bis zu den ersten Larvalstadien vorerst nicht ausgebildet (Manca-Stadium). Die *Dll* Expression bleibt in dem achten Thoraxsegment schwächer und auf ein Feld von ca. zehn Zellen beschränkt. In den Pleopoden splittet sich das Feld Dll positiver Zellen später auf und wird in dem zweiästigen Beinen exprimiert. Der detaillierte Ablauf wird nachfolgend beschrieben.

Die Expression des Gens *Dll* in den Segmenten der Thorakopoden

Die Expression des Gens *Dll* beginnt bei *Porcellio scaber* erst, nachdem die Expression des Gens *en* in der Reihe a etabliert ist (Abb. 17A, B). Die Zelle d_3 beginnt mit der Expression, wenn sich die Zelle d_1 bereits geteilt hat. Die Zelle d_4 beginnt mit der *Dll* Expression zu dem Zeitpunkt, an dem die Zelle d_2 ihre erste differentielle Teilung vollzieht. Die beiden Dll positiven Zellen führen nun ihre erste differentielle Teilung durch. Die aus der Querteilung resultierenden Tochterzellen von d_4 bleiben beide Dll positiv (Abb. 17C, D). Im Gegensatz dazu stellt die innere Tochterzelle der Zelle d_3 ihre *Dll* Expression nach der Mitose ein (Abb. 17C, D). Es resultieren daraus drei nebeneinander liegende Dll positive Zellen: d_{3e} , d_{4i} und d_{4e} . Als nächste beginnt die anterior angrenzende Zelle c_{4h} ebenfalls mit der *Dll* Expression. Ungefähr zeitgleich ist der Beginn der *Dll* Expression in der lateral angrenzenden Zelle d_{3i} zu beobachten. Die *Dll* Expression in der Zelle d_{3i} in Thorakopoden bildenden Segmenten bleibt schwach und geht später wieder verloren (Abb. 17C, D). Darauf folgt die posterior angrenzende Zelle a_3 . Diese *en* exprimierende Zelle aus der hinteren genealogischen Einheit hat noch nicht ihre erste differentielle Teilung vollzogen. Nachdem sich diese Zelle geteilt hat, behalten beide Tochterzellen die *Dll* Expression bei (Abb. 17C, D). Der Cluster von Dll positiven Zellen breitet sich weiter aus, indem sich nacheinander die Zellen d_{4e} und d_{3e} quer teilen. Eine weitere Zelle der Reihe a beginnt danach ebenfalls mit der *Dll* Expression, es ist die Zelle a_{2v} . Die Zelle d_{4i} führt ebenfalls eine Querteilung durch. Mit dem weiteren Aufwölben der Beinknospe teilt sich auch die Zelle c_{4h} längs und beide Tochterzellen behalten die *Dll* Expression bei.

Die bis zu diesem Zeitpunkt Dll positiven Zellen bilden das Bein. Das Auswachsen des Beines erfolgt sowohl durch Zellteilungen an der prospektiven Beinspitze, als auch an den seitlichen Bereichen.

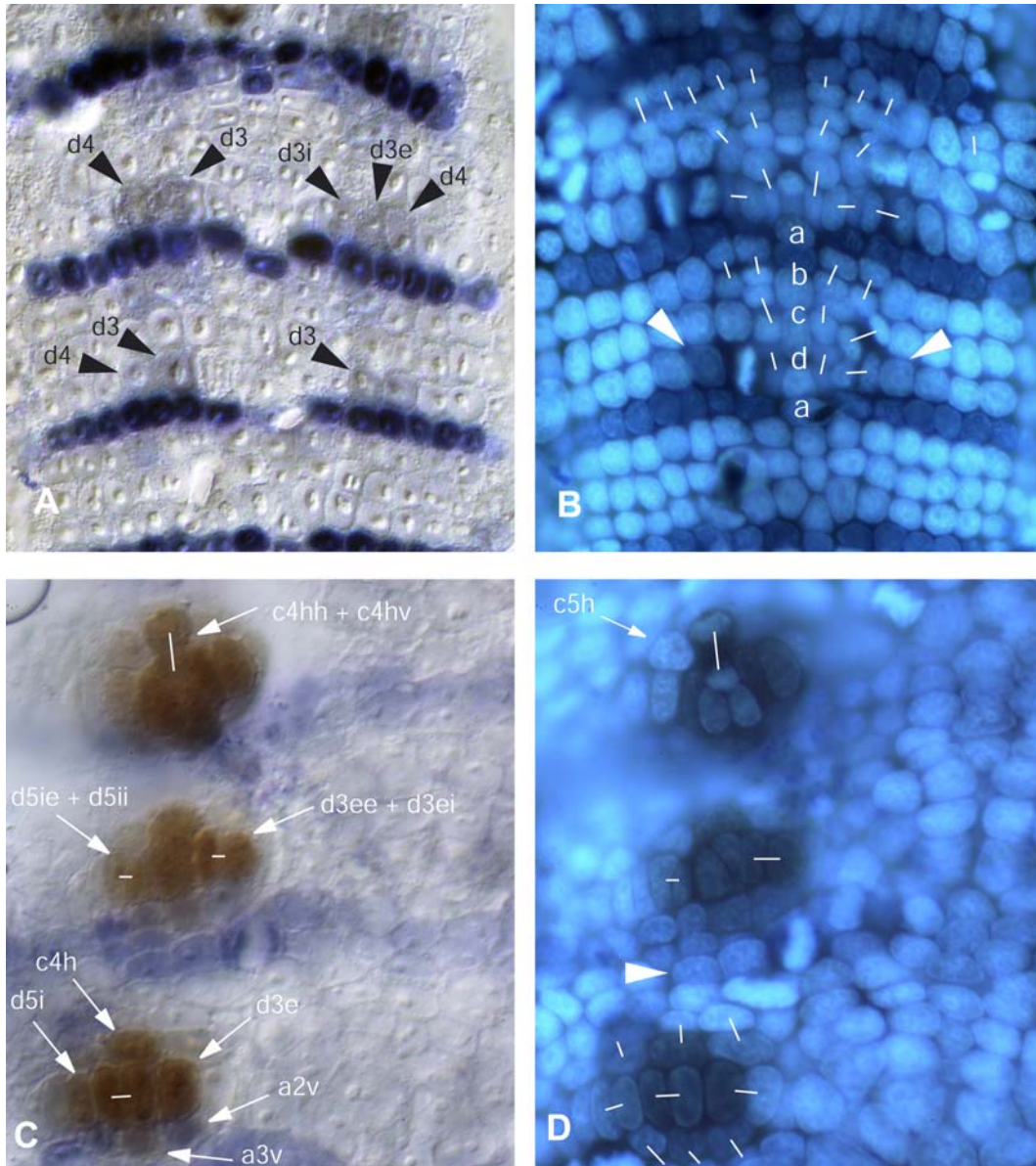


Abb. 17: **Beginn und Verlauf der *Dll* Expression im Thoraxbereich des Keimstreifs von *Porcellio scaber*.** Keimstreifpräparate mit Doppelmarkierung von Dll (braun) und En (blau), links DIC, rechts Hoechstfärbung vom jeweils gleichen Stadium. (A, B) Vor Beginn der differentiellen Teilungen ist keine *Dll* Expression nachweisbar. Mit Beginn der differentiellen Teilungen beginnt die Expression in Zelle d₃ und weitet sich auf die Nachbarzelle d₄ aus (Dll positive Zellen mit schwarzen Pfeilspitzen markiert). Nach der Teilung von d₃ bleiben zunächst beide Tochterzellen Dll positiv. (C, D) *Dll* Expression in der rechten Körperseite. Beide Tochterzellen von d₄ exprimieren *Dll*, während die Expression in d_{3i} abgeschaltet wurde. An diese Zellen angrenzende beginnen mit der *Dll* Expression: c₄h, d₅i, a₂v und a₃v. Im anterior angrenzenden Segment teilt sich die Zelle d₅i und d₃e. Beide Tochterzellen sind zunächst Dll positiv, im anterior gelegenen Segment schwächt sich die *Dll* Expression in der Zelle d₅ie wieder ab (Zelle posterior zu c₅h).

Die Expression des Gens *Dll* in den pleonalen Segmenten von *Porcellio scaber*

In den pleonalen Segmenten ist die Expression des Gens *Dll* gegenüber dem Muster in den Thorakopoden leicht abgewandelt. Sie beginnt auf gleiche Weise. Die Zelle d_3 beginnt mit der Expression, die Nachbarzelle d_4 exprimiert als nächste ebenfalls *Dll* (Abb. 18A, B). Diese Ausweitung der *Dll* Expression verläuft im Vergleich zu den weiter anterior gelegenen Segmenten schneller. In kaum einem Präparat war nur die Zelle d_3 *Dll* positiv. Nach der Teilung dieser Zellen exprimieren beide Tochterzellen von d_4 *Dll* und die äußere Tochterzelle von d_3 , d_{3e} , ist ebenfalls *Dll* positiv (Abb. 18A, B). Die angrenzenden Zellen c_4 , a_3 und a_4 beginnen ebenfalls mit der *Dll* Expression (Abb. 18C, D). Die differentiellen Teilungen entsprechen denen in den Thoraxsegmenten. Die in den Thoraxsegmenten nur schwach *Dll* exprimierende Zelle d_{5i} exprimiert in den Pleonsegmenten deutlich *Dll* (Abb. 18E, F). Hier weitet sich die *Dll* Expression auch auf die Zellen d_{5e} und d_{6i} aus (Abb. 18E, F). Diese Zellen wölben sich auf und werden zu dem späteren Exopoditen des Pleopoden.

In den Pleopoden weitet sich bei *Porcellio scaber* die *Dll* Expression auf weiter lateral gelegene Zellen aus, als in den Thorakopoden. Die Zelle d_{5e} befindet sich auf der Spitze des Exopoditen. Die Zelle d_{6i} bildet die laterale Seite des Exopoditen (Abb. 18E, F).

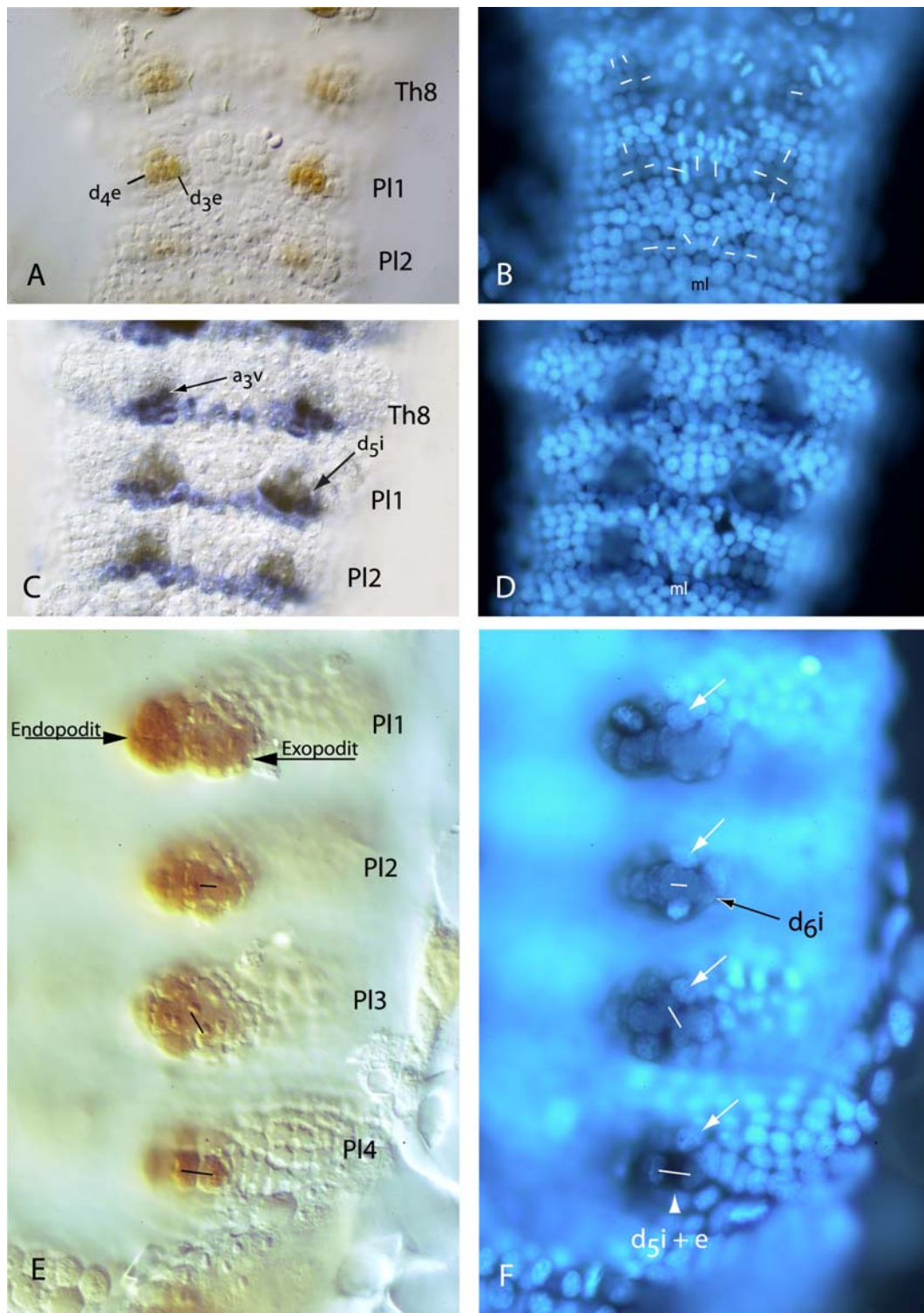


Abb. 18: **Der Verlauf der *DII* Expression im Pleonbereich des Keimstreifs von *Porcellio scaber*.** Links: DIC mit immunhistochemischer Färbung von *DII* (braun) und *En* (blau – nur bei C), rechts Hoechstfärbung. (A, B) Die Zellen *d*_{3e} und beide Tochterzellen von *d*₄ und die anterior angrenzende Zelle *c*_{4h} sind *DII* positiv. Im anterioren 8. Thoraxsegment (Th8) sind die gleichen Zellen und zusätzlich die Zelle *c*_{3h} *DII* positiv. (C, D) Späteres Stadium als (A, B). Die *DII* Expression im 1. Pleopod (PI1) hat sich auf die Tochterzellen von *d*₅ und auf die Zellen 3, 4 und 5 aus Reihe a ausgeweitet. Im Th8 ist das Feld *DII* positiver Zellen kleiner geworden. Es exprimieren nur noch Zellen der Reihe *d* und *a* *DII*. In Zellen der Reihe *c* ist *DII* nicht nachweisbar. (E, F) Blick auf die Spitze des Exopoditen. Im 4. Pleopod (PI4) teilt sich die *DII* positive Zelle *d*₅. Die Tochterzellen dieser Teilung sind mit einem Balken verbunden. Der weiße Pfeil zeigt auf die ebenfalls *DII* positive Zelle *c*_{5h}. Weiter anterior ist die Zelle *d*_{6i} ebenfalls *DII* positiv. Die Tochterzellen der Zelle *d*_{6e} befinden sich auf der Spitze des Exopoditen. Beide Äste des Pleopoden bilden sich aus einem *DII* positiven Feld von Zellen aus.

Die *Dll* Expression im 8. Thorakopod von *Porcellio scaber*

Wie den Mictacea, Cumacea und Tanaidacea fehlt den Larven der Isopoda beim Schlüpfen vorerst der achte Thorakopod (Manca-Stadium). In den Keimstreifen wachsen die anderen Thorakopoden und die posterior gelegenen Pleopoden aus, während sich im achten Thoraxsegment nur eine flache Knospe bildet (Abb. 19).

Im achten Thoraxsegment, welches aus Abkömmlingen der ET-Derivatreihe eX und eXI besteht, wurde keine zeitliche Verzögerung der differentiellen Teilungen beobachtet (Abb. 18B, D). Das *Dll* Expressionsmuster im 8. Thoraxsegment entspricht zu Beginn dem in den anderen Thoraxsegmenten. Die Morphogenese führt hier nur zu einer abgeflachten Knospe (Abb. 19B). Das Feld *Dll* exprimierender Zellen umfasst zunächst die Zellen d_3e , d_4i , d_4e , a_3 , a_4 , a_5 sowie c_3h und c_4h (Abb. 18A, B). Die Reihenfolge, in der die Zellen *Dll* exprimieren, ist die gleiche wie in den Thoraxsegmenten. Die Expression wird jedoch im weiteren Verlauf in den Zellen der Reihe c beendet (Abb. 18C). Im weiteren Verlauf der Entwicklung ist im achten Thoraxsegment immer ein Feld *Dll* positiver Zellen zu beobachten.

Spätere *Dll* Expression in den Thorakopoden und Pleopoden von *Porcellio scaber*

Mit dem Auswachsen der Thorakopoden bleibt die Beinspitze *Dll* positiv. Es bildet sich an der Basis eine erste Einschnürung (Abb. 20A). Die Zellen, die distal von dieser Einschnürung liegen, sind *Dll* positiv. Ein Gradient des *Dll* Proteins ist in den homonom, stabförmig ausgewachsenen Beinen nicht zu erkennen (Abb. 20A). Diese weiter auswachsende Beinspitze bildet nun Einschnürungen. Insgesamt unterteilt sich der Thorakopod in sechs Abschnitte, von denen nur die distalen vier *Dll* exprimieren (Abb. 20C). Die Einschnürungen beginnen proximal und weiten sich dann nach distal aus.

In den auswachsenden Pleopoden bilden sich distal zwei Loben. Das vorerst zusammenhängende Feld *Dll* positiver Zellen spaltet sich im Verlauf der Entwicklung in zwei getrennte Felder auf (Abb. 20B, C). Die beiden Loben bilden den Endo- und den Exopoditen des Pleopoden. Beide Äste flachen sich später ab (Abb. 20C). In den Uropoden verläuft die Entwicklung der *Dll* Expression wie in den Pleopoden, das Abflachen der Äste bleibt jedoch aus (Abb. 20C).

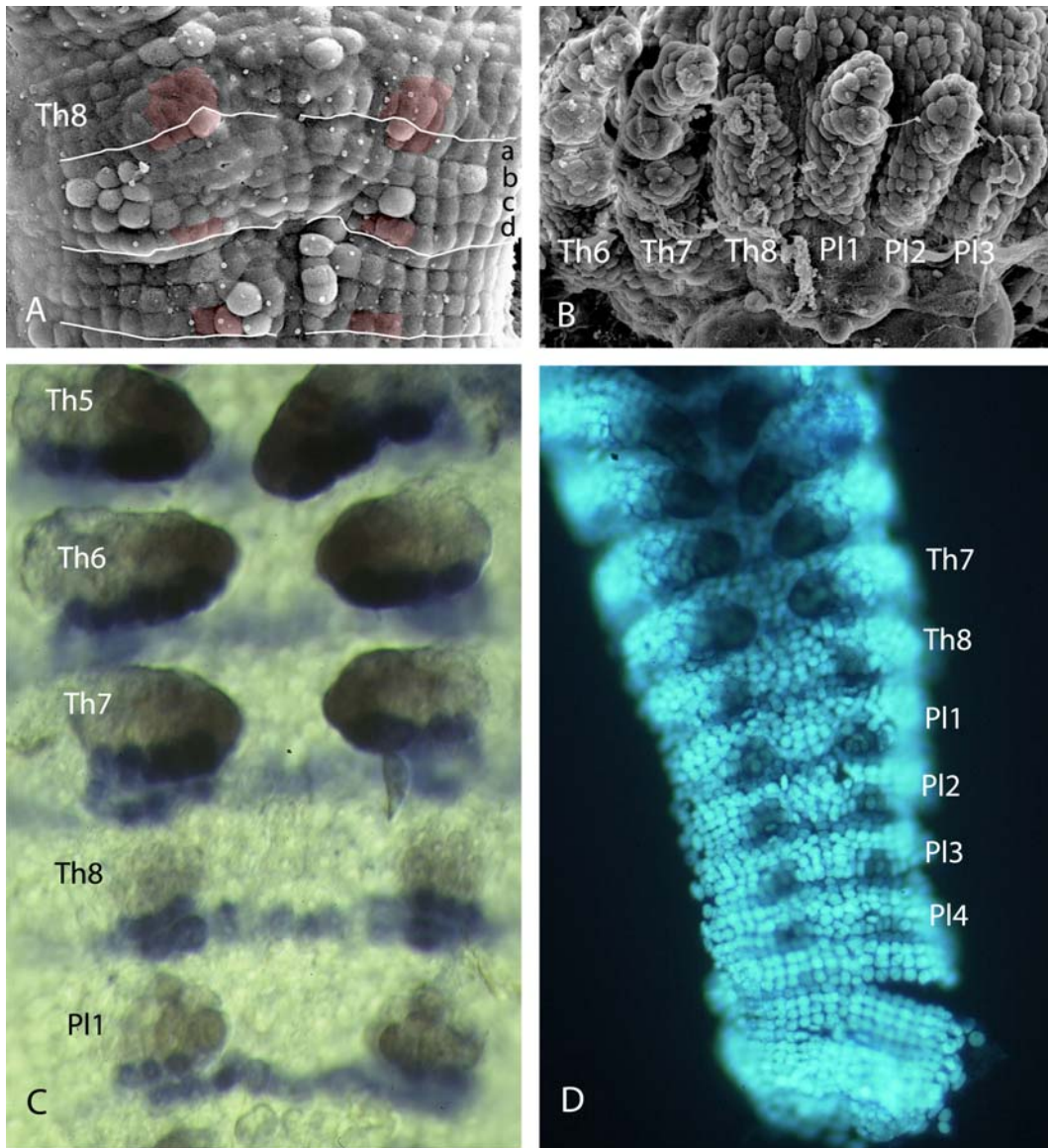


Abb. 19: **Morphologie und *Dll* Expression im 8. thorakalen Segment von *Porcellio scaber*.** (A) REM-Bild: Die genealogischen Grenzen sind mit durchgehenden Linien markiert. Die Zellen, die *Dll* exprimieren, sind rot markiert (Rekonstruktion anhand von Präparaten). Im 8. Thoraxsegment bildet sich eine abgeflachte Beinknospe, in der *Dll* exprimiert wird. (B) Fortgeschrittenes Stadium. Die einästigen Thorakopoden und die posterior gelegenen zweiästigen Pleopoden wachsen aus. Der 8. Thorakopod besteht lediglich aus einer Knospe. (C) Ausschnitt aus (D). Doppelmarkierung von *Dll* (braun) und *En* (blau), DIC. Das Feld *Dll* positiver Zellen im 8. Thorakopod (Th8) ist kleiner, als das, der umliegenden Beinknospen. (D) Hoechstfärbung des Präparats von (D). Die differentiellen Teilungen im 8. Thoraxsegment sind ihrer Lage entsprechend weit fortgeschritten, während die Morphogenese des Beines noch nicht begonnen hat.



Abb. 20: **Expression von *Dll* in den Extremitäten des postnaupliaren Keimstreifs von *Porcellio scaber*.** *Dll* ist immunhistochemisch angefärbt (braun). (A) Die Thorakopoden bilden Einschnürungen (weißer Pfeil). Distal exprimieren die Zellen *Dll*. In den Maxillen exprimieren ebenfalls distal gelegene Zellen *Dll* (schwarze Pfeile). (B) *Dll* Expression in den Pleopoden. Aus dem Feld *Dll* positiver Zellen haben sich zwei Loben gebildet, an deren Rand *Dll* exprimiert wird. In den Spitzen der Coxalplatten (Cx) sind Zellen *Dll* positiv. In den Uropoden exprimieren ebenfalls beide Äste *Dll*. (C) Die Thorakopoden haben im distalen Teil vier Einschnürungen gebildet. Die dadurch entstehenden fünf Beinsegmente exprimieren, bis auf das proximale, *Dll*. In den Pleopoden haben sich beide Loben bereits abgeflacht und das Feld *Dll* positiver Zellen hat sich aufgespalten (weiße Pfeile).

Die *Dll* Expression in Reihe E(1), E(2) und E(3) bei *Porcellio scaber*

Das Expressionsmuster von *Dll* in den genealogischen Einheiten, die nicht von ET gebildet werden, erfährt durch die veränderten Zellteilungsmuster und durch die morphologischen Ausprägungen der Extremitäten Veränderungen.

Die posterioren Zellen der genealogischen Einheit E(3) bilden zusammen mit den anterioren Abkömmlingen der ET-Derivate eI, den ersten Thorakopoden

(Maxilliped). Der Verlauf der *Dll* Expression in dieser Extremitätenknospe ist mit dem der weiter posterior gelegenen Thorakopodenknospen identisch. Daher wird auf die Beschreibung des Verlaufs der *Dll* Expression bei den Thorakopoden im oberen Abschnitt verwiesen.

Anterior wird durch Abkömmlinge der Reihe E(2) und E(3) die Knospe der zweiten Maxille gebildet, die sich morphologisch zunächst nicht von der ersten unterscheidet. Das zugrunde liegende Zellteilungsmuster ist mit dem der weiter posterior gelegenen Thorakopoden weitgehend identisch, das Muster der *Dll* Expression unterscheidet sich jedoch von dem in den Thorakopoden.

Die erste Maxille wird aus den hinteren Abkömmlingen der Reihe E(1) und vorderen der Reihe E(2) gebildet. In dieser Extremitätenknospe ist das Zellteilungsmuster in der Reihe c und d völlig anders als in den hinteren Extremitäten, das Feld der *Dll* exprimierenden Zellen ähnelt jedoch sehr dem der posterior gelegenen zweiten Maxille.

Die Expression von *Dll* in Reihe E(1) bei *Porcellio scaber*

Die *Dll* Expression beginnt im posterioren Teil der Reihe E(1) nicht in der dritten Zelle von innen, wie dies in allen anderen postnauplialen Segmenten zu beobachten war, sondern in der zweiten Zelle von innen (Abb. 12B). Dies ist ebenfalls die Zelle d_3 , da die innere Zelle der Reihe sich nach anterior verschoben hat und die Nachbarzellen dadurch um eine Zelle nach innen verschoben wurden. Die Expression beginnt, bevor die differentiellen Teilungen in der Reihe E(1) begonnen haben (Abb. 12A, B). Die Expression weitet sich erst nach lateral aus, nachdem sich die Zellen d_3 und d_4 geteilt haben. Wie in den thorakalen Segmenten stoppt die Zelle d_3 die *Dll* Expression während ihre Schwesterzelle diese beibehält. Die Nachbarzellen d_4 und d_4e beginnen ebenfalls *Dll* zu exprimieren (Abb. 21A). Im Verlauf der weiteren Teilungen verlieren die Abkömmlinge der Zelle d_4 ihre *Dll* Expression (Abb. 21C).

Die *Dll* Expression in Reihe E(2) bei *Porcellio scaber*

Obwohl die differentiellen Teilungen in Reihe E(2) denen der weiter posterior gelegenen Reihen entsprechen, ähnelt das späte Expressionsmuster des Gens *Dll* mehr der anterior gelegenen Reihe E(1) (Abb. 21B). Nach Beginn der *Dll* Expression in Zelle d_3 behält, nach der Teilung, nur die Tochterzelle d_3e die *Dll* Expression

(Abb. 21A). Die Zelle d_4 ist Dll negativ (Abb. 21A). Die Dll positiven Zellen bilden die Spitze der zweiten Maxille, die sich morphologisch von den Thorakopoden unterscheiden. Im weiteren Verlauf vergrößert sich das Feld Dll positiver Zellen an der Maxillenspitze nur gering (Abb. 21B). Es ist davon auszugehen, dass diese Vergrößerung durch Teilung der Zelle d_3 in zwei Dll positive Zellen erfolgt und nicht durch Neubeginn der Expression in Abkömmlingen der Zelle d_4 . Die *Dll* Expression konnte aufgrund der Aufwölbung der Maxillenknospe nicht eindeutig einzelnen Zellen zugeordnet werden.

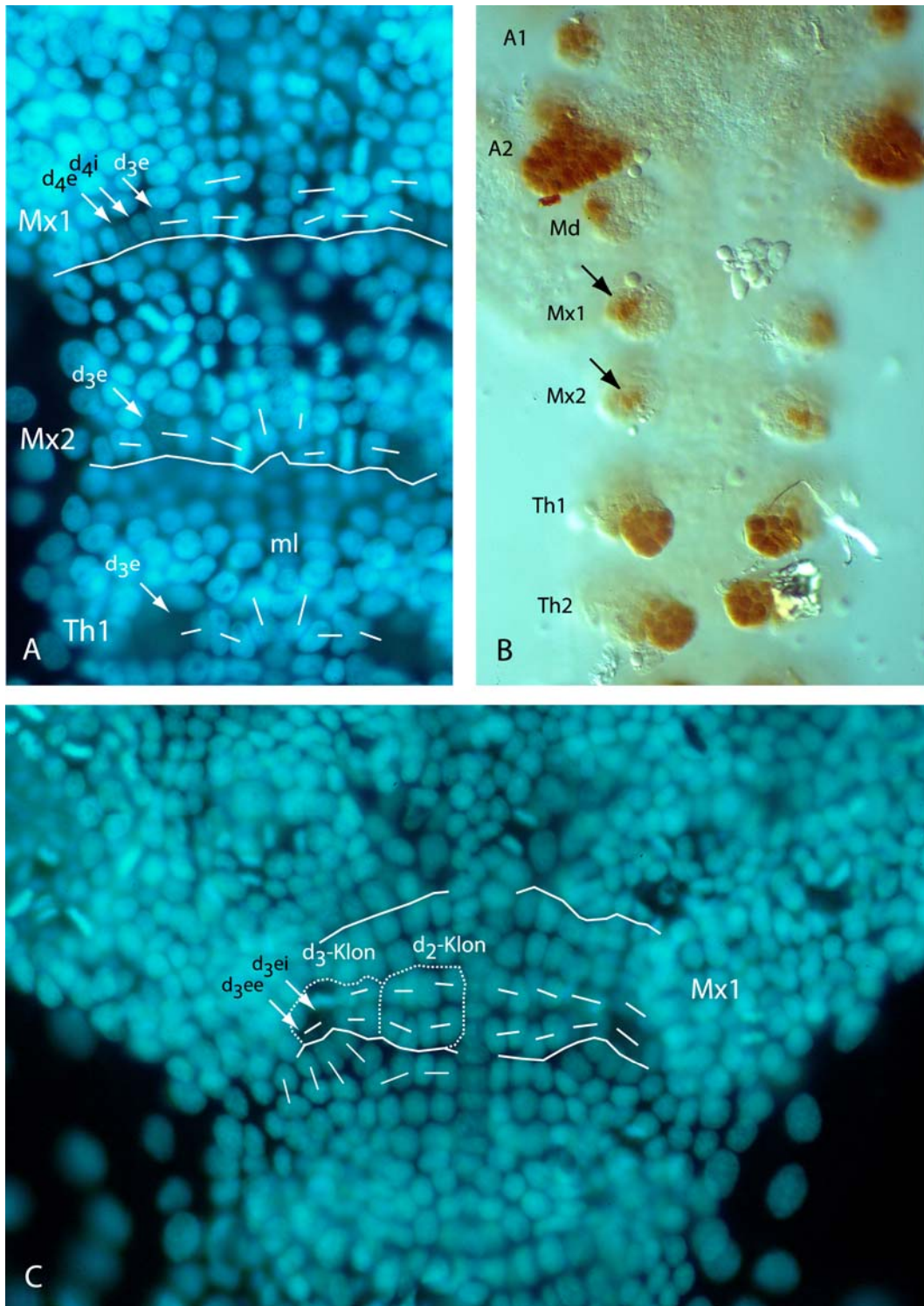


Abb. 21: **Dll Expression in den vorderen Reihen E(1), E(2) und E(3) von *Porcellio scaber*.** (A) Hoechstfärbung von einem Präparat, in dem Dll immunhistochemisch angefärbt wurde. In der ersten Maxille (Mx1) exprimieren die Zellen d_{3e}, d_{4i} und d_{4e} Dll. In der Knospe der zweiten Maxille exprimiert nur die Zelle d_{3e} Dll. Im ersten Thoraxsegment exprimieren die Zellen d_{3e} und die lateral davon gelegenen Zellen d_{4i} und d_{4e} Dll. (B) Immunhistochemische Färbung von Dll (braun). Die Kopfextremitäten erste (A1) und zweite Antenne (A2), Mandibel (Md) und die Maxillen (Mx1/Mx2) sind Dll positiv. Die Maxillen besitzen ein Dll positives Feld bestehend aus zwei bis drei Zellen an ihrer Spitze (schwarze Pfeile). In den Thorakopoden (Th1 und Th2) exprimieren die distalen über der Einschnürung liegenden Zellen Dll. (C) In dem Segment der ersten Maxille (Mx1) exprimieren die Abkömmlinge der Zelle d_{3e} Dll. Die vorher Dll exprimierenden Zellen der Mutterzelle d₄ haben die Dll Expression gestoppt.

3.3 Die Zelllinie und Genexpression bei *Orchestia cavimana*

Über die Zelllinie liegen bei Amphipoden bereits detaillierte Beschreibungen vor (siehe Scholtz 1990; Scholtz et al. 1994; Gerberding und Scholtz 1999). Obwohl die Analyse der lateralen Teilungen an der Amphipodenart *Gammarus pulex* durchgeführt wurde (Scholtz 1990), ist aufgrund der bisher beobachteten Konstanz der Zellteilungsmuster innerhalb der Peracaridentaxa davon auszugehen, dass die Zelllinie bei *Orchestia cavimana* weitgehend übereinstimmt. Zudem wurden bei den durchgeführten Untersuchungen keine Unterschiede zwischen dem Zellteilungsmuster von *Orchestia cavimana* und dem bei *Gammarus pulex* beschriebenen beobachtet. Daher wird hier auf eine detaillierte Beschreibung der Zelllinie verzichtet. Ebenso wurden Untersuchungen des Expressionsmusters von *en* an Amphipoden publiziert (Scholtz et al. 1994; Dohle und Scholtz 1995; Scholtz und Dohle 1996). Auf das Expressionsmuster von *en* in *Orchestia cavimana* wird insoweit eingegangen, dass durch die in Doppelmarkierungen von *En* und *Dll* eine zeitliche Korrelation der Expressionsmuster beider Gene möglich geworden ist.

Die Expression des Gens *Dll* bei *Orchestia cavimana*

Die Expression von *Dll* in den thorakalen Segmenten

Die Expression des Gens *Dll* beginnt bei *Orchestia cavimana* im nauplialen Bereich des Keimstreifs. Im postnauplialen Bereich beginnt die Expression in jedem Segment wie bei *Porcellio scaber* in der Zelle d_3 und breitet sich auf die Zelle d_4 nach lateral aus (Abb. 22 und Abb. 23). Zu diesem Zeitpunkt hat sich die posterior angrenzende Reihe a noch nicht vollständig gebildet, lediglich die inneren Zellen ab_1 und ab_2 haben sich bereits geteilt. Auch die *en* Expression hat zu diesem Zeitpunkt in vielen Präparaten in der Reihe a noch nicht begonnen. Wenn die differentiellen Teilungen mit der Zelle d_1 beginnen, hat sich die *Dll* Expression bereits auf die Zellen d_5 und d_6 ausgeweitet (Abb. 22A, B). Jetzt erst exprimieren alle posterior gelegenen Zellen der Reihe a *en*. Die laterale Ausbreitung durch die Übernahme der *Dll* Expression verläuft bis zu der Zelle d_8 . (Abb. 22B) Dieses breite Feld von *Dll* Expression entspricht auch der breiten Beinknospe, wie sie bei Amphipoden vorliegt. Nach

anterior und posterior breitet sich die *Dll* Expression auf die Zellen c_4 , c_5 und c_6 sowie a_3 bis a_7 aus (Abb. 22D). Wie in *Porcellio scaber* bleibt nach der differentiellen Teilung die Zelle d_3e Dll positiv, während die Schwesterzelle d_3i kein *Dll* exprimiert (Abb. 22C). Die weitere Vergrößerung des Feldes Dll positiver Zellen erfolgt über Zellteilungen, bei denen die Tochterzellen Dll positiv bleiben. Die Zellen d_4 und d_5 teilen sich dabei quer, die Zellen d_6 , d_7 und d_8 längs (Abb. 22C, D). Von den Dll positiven Zellen, die an die Reihe d angrenzen, bleiben nach der differentiellen Teilung nur die Tochterzellen Dll positiv, die Kontakt zu *Dll* exprimierenden Zellen der Reihe d haben. Dabei wirkt sich der Verlust der *Dll* Expression in den lateral gelegenen Zellen der Reihe d aus. Die vorher Dll positiven Zellen d_6e und die Tochterzellen von d_7 und d_8 stellen ihre *Dll* Expression wieder ein (Abb. 22D). Nur die, an die jetzt noch Dll positiven Zellen der Reihe d angrenzenden Zellen, exprimieren *Dll*. Die weitere Entwicklung ist an das Aufrichten und Auswachsen des Thorakopoden gekoppelt. An der Spitze des Beines und an den Seiten finden Zellteilungen statt (Abb. 22E, F).

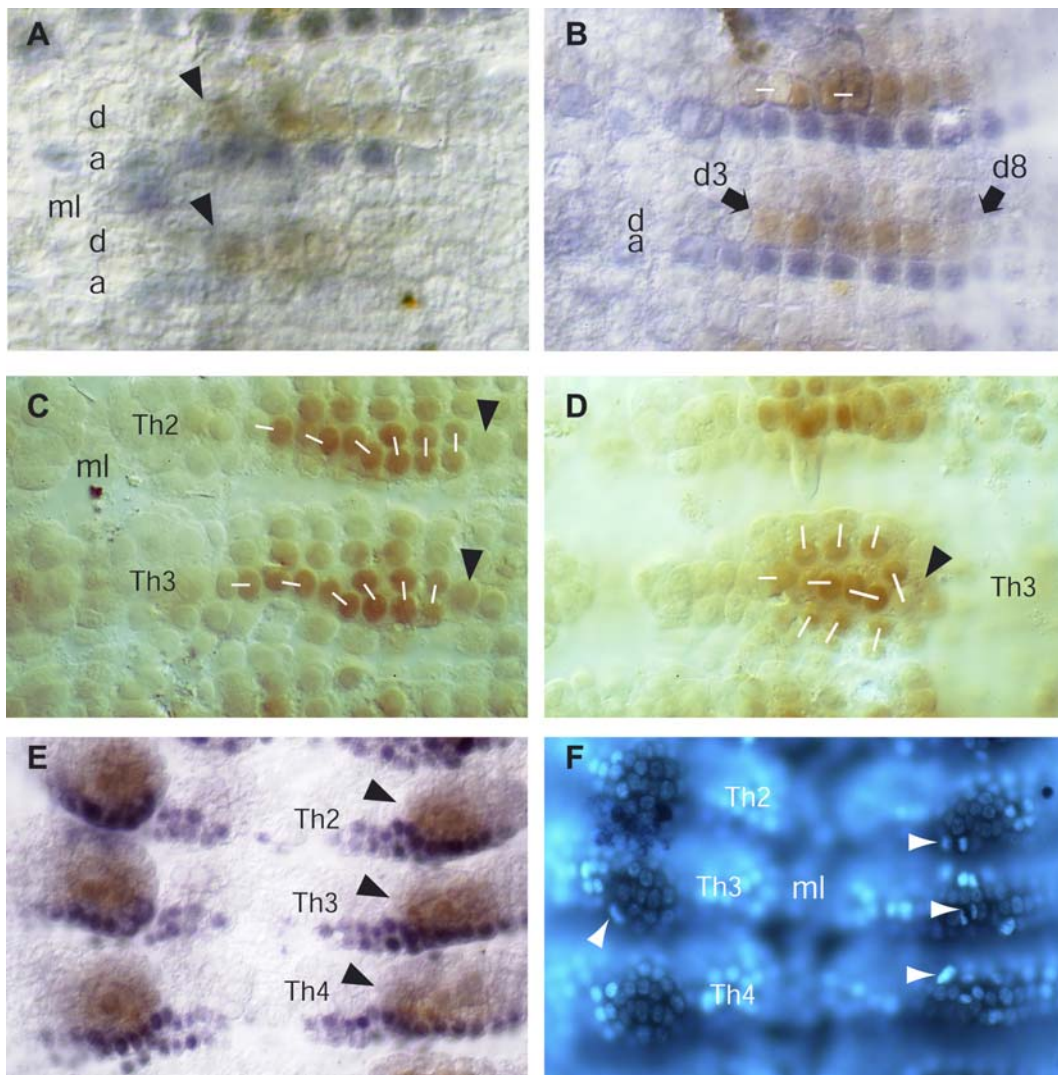


Abb. 22: **Verlauf der *Dll* Expression im zweiten und dritten Thorakopod von *Orchestia cavimana*.** (A) Doppelfärbung von En (blau) und *Dll* (braun), DIC. Die *Dll* Expression umfasst die Zellen d_3 (Pfeilspitze), d_4 , d_5 und a_4 . Die differentiellen Teilungen haben in den vier Zellreihen d, c, b, und a noch nicht begonnen (ml: Mittellinie). (B) Die *Dll* Expression umfasst alle Zellen zwischen d_3 und d_8 . In der anterior gelegenen Beinknospe teilen sich die Zellen d_3 und d_5 . Die Tochterzellen von d_5 sind beide *Dll* positiv. (C) Die Expression von *Dll* hat sich im 3. Thoraxsegment auf Zelle d_9 (Pfeilspitzen) ausgeweitet. Der innere Abkömmling von Zelle d_3 stoppt die *Dll* Expression. Im in der Entwicklung weiter fortgeschrittenen zweiten Thoraxsegment (Th2) ist die Zelle d_9 wieder *Dll* negativ. Aus Reihe c exprimieren die Zellen c_4 , c_5 , c_6 und c_7 *Dll*. (D) Im dritten Thorakopoden reduziert sich das Feld *Dll* positiver Zellen. Die am weitesten lateral gelegene Zelle aus Reihe d in der *Dll* nachzuweisen ist, ist die Zelle d_{6v} . In den weiter lateral gelegenen Zellen ist die *Dll* Expression abgeschaltet (Pfeilspitze). (E, F) Späteres Stadium, links DIC mit Doppelfärbung von En und *Dll*, rechts Hoechstfärbung. Durch Zellteilungen (weiße Pfeilspitzen) an der Spitze und am Rand wächst das Bein aus. Die *Dll* Expression bleibt auf die Spitze beschränkt (schwarze Pfeilspitzen).

Die Expression von *Dll* in den pleonalen Segmenten von *Orchestia cavimana*

In den Pleopoden ist das Expressionsmuster von *Dll* zunächst gleich. Der Entwicklungsverlauf ist gegenüber den weiter anterior gelegenen Segmenten beschleunigt. Die *Dll* Expression beginnt, bevor sich in der posterior zu der Reihe d

gelegenen Reihe a eine *en* Expression etabliert hat (Abb. 23A). Die Expression von Dll weitet sich wie in den Thorakopodenknospen nach lateral auf die Zelle d₇ aus. Nach der Teilung von d₇ übernehmen noch weiter lateral gelegene Zellen die *Dll* Expression (Abb. 23B, C). Im Gegensatz zu der Thorakopodenentwicklung behalten diese Zellen die Dll Expression bei und bilden durch Zellteilungen und Aufwölbung den Exopoditen des Pleopoden (Abb. 23B, C). Die inneren Zellen bilden die Spitze des Endopoditen.

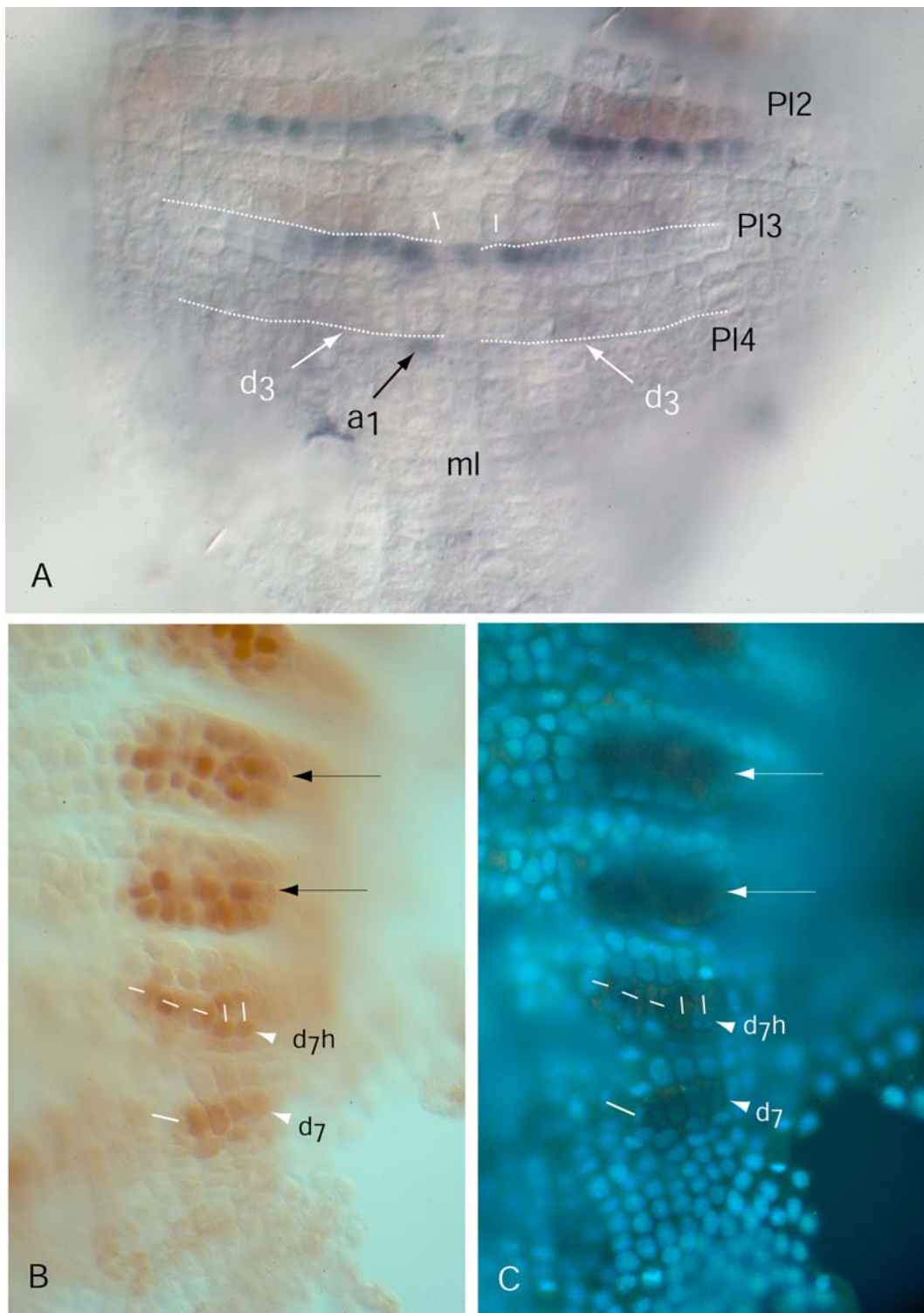


Abb. 23: **Verlauf der *Dll* Expression in den Pleopoden von *Orchestia cavimana*.** (A) Doppelmarkierung von En (blau) und *Dll* (braun). DIC. Im vierten Pleonsegment (PI4) beginnt die *Dll* Expression in Zelle d_3 . Die *en* Expression in der posterior gelegenen Reihe a hat in der linken Körperseite noch nicht begonnen, in der rechten Körperseite ist die Zelle a_1 En positiv. Die Reihen a, b, c, und d sind in diesem Bereich durch die gestrichelte Linie eingegrenzt. Die anteriore Zelle d_1 hat die erste differentielle Teilung vollzogen. Die Tochterzellen sind durch Balken verbunden. (B, C) Späteres Stadium der Pleopodenknospen. Links DIC, rechts Hoechstfärbung. Die Zellen d_3 (in Teilung) bis d_7 sind *Dll* positiv. Anterior dazu hat sich die Zelle d_7 in d_{7h} und d_{7v} geteilt. Lateral dazu gelegene Zellen exprimieren ebenfalls *Dll*. In den weiter anterior gelegenen Pleopodenknospen exprimieren die Zellen weiterhin *Dll* und bilden die Spitze des Exopoditen (Pfeile).

Die Expression von *Dll* in Reihe E(1) und E(2) bei *Orchestia cavimana*

Alle Reihen des postnauplialen Keimstreifs bei Amphipoden werden nicht von Ektoteloblasten gebildet, sondern entstehen aus Zellen, die sich in Reihen anordnen (Scholtz 1990). Das Zellteilungsmuster zwischen den Reihen E(1) und E(2) unterscheidet sich insofern, als dass in der Reihe E(2) die typischen differentiellen Teilungen zu sehen sind, wie sie in bisher untersuchten Peracarida vorkommen. Reihe E(1) weicht jedoch davon ab und zeigt ein ähnliches Muster wie die Reihe E(1) bei *Porcellio scaber*.

Während der Bildung der Reihe E(1) verschiebt sich eine innere Zelle in die anterior gelegene Zellreihe. Dadurch verschieben sich die Zellen der Reihe d um eine Zelle zur Mittellinie hin. Die Zelle d_2 grenzt somit an die Mittellinie. Die Präparate von *Orchestia cavimana* zeigen den Beginn der Expression in der Zelle d_3 der Reihe E(1), deren innere Tochterzelle d_{3i} nach der Teilung die *Dll* Expression verliert (Abb. 24A, B). Die *Dll* Expression weitet sich auf die weiter lateral gelegene Zelle d_4 aus (Abb. 24A, B). Das Feld *Dll* positiver Zellen an der Spitze der ersten Maxille ist bei *Orchestia cavimana* größer als bei *Porcellio scaber* und umfasst ungefähr sieben bis acht Zellen (Abb. 24). An diesem Cluster sind auch Zellen der posterior angrenzenden Reihe a beteiligt.

An der Spitze der zweiten Maxille bildet sich ein ähnlich großer Cluster von *Dll* positiven Zellen. Dieser Cluster kann Abkömmlingen der Zellen d_{3e} und d_4 , sowie anterioren Abkömmlingen der Reihe a zugeordnet werden (Abb. 24). Da die Zellen der Reihe d strikt ihre Teilungsebenen senkrecht zur Mittellinie ausrichten, liegt dieser Cluster gegenüber den Thorakopoden weiter lateral (Abb. 24C, D).

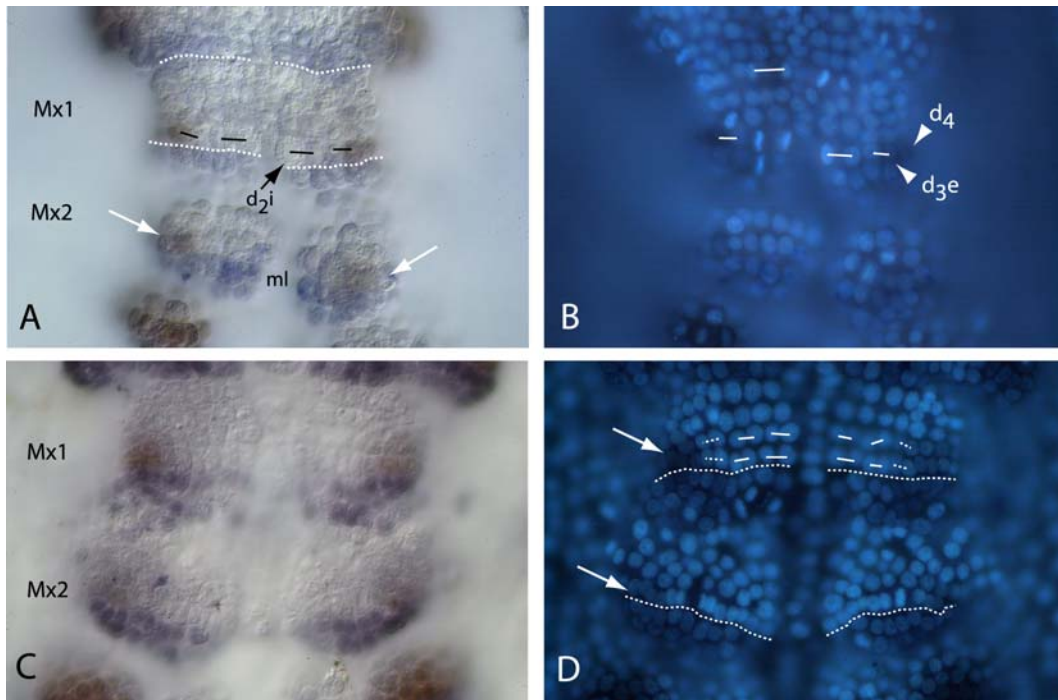


Abb. 24: **Verlauf der *Dll* Expression in den Reihen E(1) und E(2) bei *Orchestia cavimana*.** (A, B) Links DIC, rechts Hoechstfärbung. Die Zellen d_{3e} und d_4 der Reihe E(1) im Segment der ersten Maxille (Mx1) sind *Dll* positiv. Tochterzellen sind durch einen Balken miteinander verbunden, die genealogische Grenze der Reihe E(1) ist durch gestrichelte Linien eingegrenzt. In der Spitze der auswachsenden zweiten Maxille (Mx2) sind fünf *Dll* positive Zellen zu sehen (weißer Pfeil). (C, D) Die Zellteilungen im Segment der ersten Maxille sind fortgeschritten. Tochterzellen verbindet ein durchgehender Balken, die Abkömmlinge von Zelle d_{3i} ein gestrichelter Balken. An der Spitze der Extremitätenknospen befindet sich ein Cluster *Dll* exprimierender Zellen (weißer Pfeil).

3.4 Genexpression und Morphogenese der Intersegmentalfurchen und Beinknospen bei *Orchestia cavimana* und *Porcellio scaber*

Die REM Analysen der Keimstreifen zeigen die Morphogenese der Intersegmentalfurchen bei den beiden untersuchten Arten (Abb. 25). Vergleicht man die REM Abbildungen mit den entsprechenden Stadien der immunhistochemisch angefärbten Präparate ergibt sich, dass sich die *En* positiven Zellen der Reihe a und die *En* negativen der Reihe b bei *Orchestia cavimana* gegenüber den Reihen c und d absenken (Abb. 25A). Später senken sich die vorderen Abkömmlinge der Reihe b, die *en* exprimieren, ab und bilden die Intersegmentalfurche (Abb. 25B). Die Zellen der Reihe a bilden den Hinterrand der Beinknospe. Zwischen der Beinknospe und der Ganglienanlage ist eine weitere Einschnürung zu erkennen, die zwischen den Zellen d_{2ee} und d_{3i} verläuft (Abb. 25B).

Die Zellen, die die Beinknospe bilden, wölben sich auf, sobald die Zellen der Reihe d *Dll* exprimieren. An der Aufwölbung beteiligen sich auch die vorerst *Dll* negativen Zellen der Reihe c, die teilweise die Zellen der Reihe d überragen (Abb. 25B). Die Beinknospe ist sehr breit, worin sich die weit nach lateral ausgeweitete *Dll* Expression widerspiegelt.

Im Gegensatz zu den *en* exprimierenden Zellen bei *Orchestia cavimana* bleiben die *En* positiven Zellen bei *Porcellio scaber* mit ihren Nachbarzellen zu Beginn in einer Ebene (Abb. 25D). Erst wenn in der anterior gelegenen genealogischen Einheit die differentiellen Teilungen beginnen, senken sich die Zellen der Reihe a gegenüber den Nachbarzellen etwas ab (Abb. 25D). Nach den ersten differentiellen Teilungen der Zellen der Reihe b senken sich die vorderen Abkömmlinge ebenfalls ab, während die Zellen der Reihe a den Hinterrand der Beinknospe bilden.

Die Zellen, die die Beinknospe bilden, bleiben vorerst in einer Ebene mit ihren Nachbarzellen, obwohl die Zellen d₃ und d₄ schon *Dll* exprimieren (Abb. 25D). Die *Dll* exprimierenden Zellen wölben sich erst auf, wenn sie ihre erste differentielle Teilung beendet haben (Abb. 25D). Die Beinknospen von *Porcellio scaber* sind auf den kleinen Bereich der *Dll* exprimierenden Zellen beschränkt und bilden keine breiten Aufwölbungen wie bei *Orchestia cavimana* (Abb. 29E, F). Die Morphogenese der Beine verläuft bei *Porcellio scaber* und *Orchestia cavimana* unterschiedlich: Während die Beine von *Porcellio scaber* eher senkrecht zum Keimstreif auswachsen, richten sich die Beine von *Orchestia cavimana* von der Mitte nach lateral auf (Abb. 25E, F).

Der Vergleich zwischen *Porcellio scaber* und *Orchestia cavimana* zeigt, dass die Zellen bei *Orchestia cavimana* in Relation zu dem Entwicklungsstadium der Zelllinie viel früher *Dll* exprimieren. Auch die Morphogenese der Beinknospe und die der Intersegmentalfurche beginnen zu einem früheren Zeitpunkt als bei *Porcellio scaber*. Ein Vergleich des Expressionsmusters von *en* in Relation zur Zelllinie ergibt ein umgekehrtes Verhältnis: Bei *Porcellio scaber* exprimieren die Zellen der Reihe ab bereits *en*, bevor sie sich geteilt haben. Bei *Orchestia cavimana* müssen die Zellen ab bereits geteilt sein, bevor die Zelle a mit der *en* Expression beginnt (Abb. 25A, D).

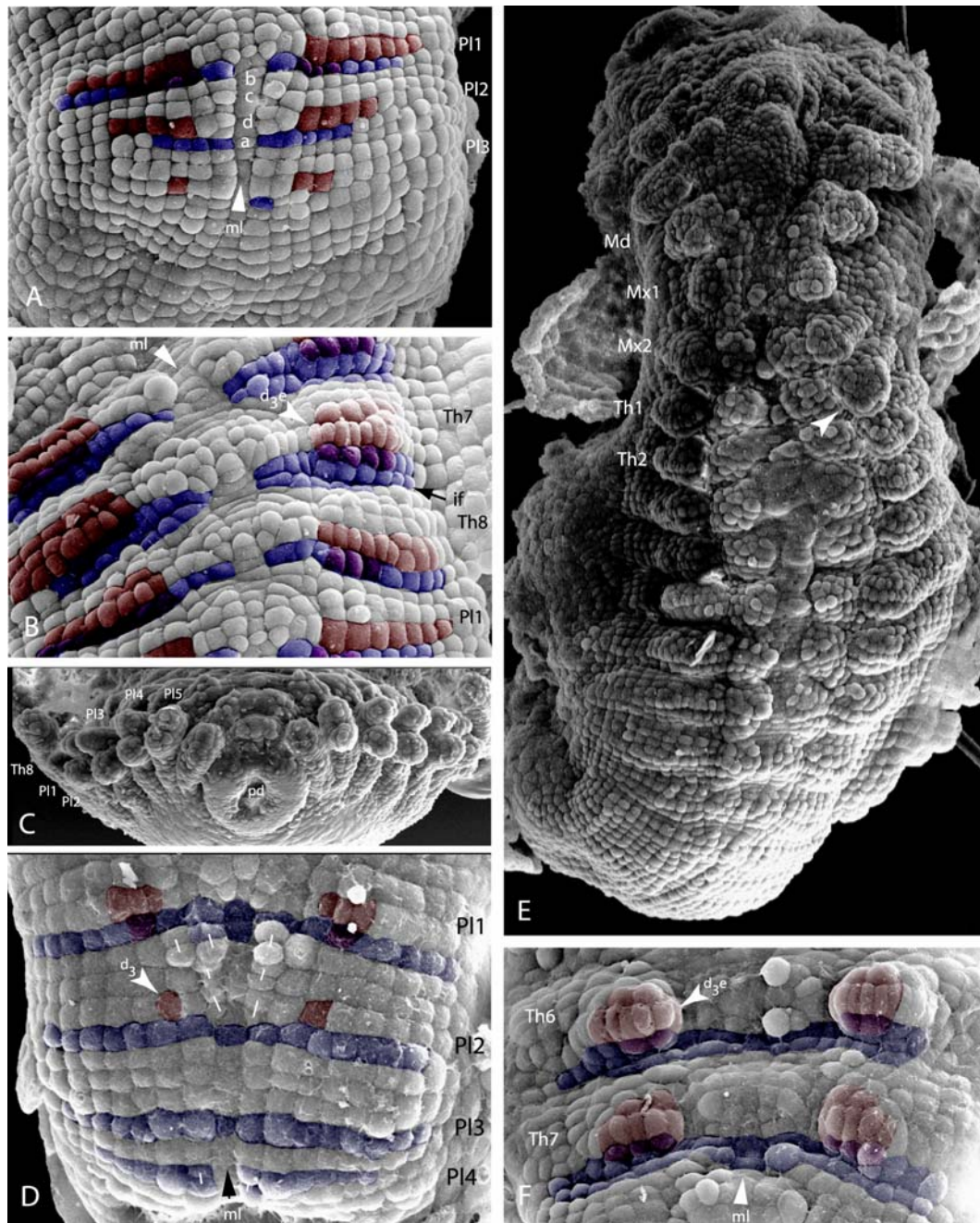


Abb. 25: **Morphogenese und Genexpression in den Segmenten von *Orchestia cavimana* und *Porcellio scaber*.** Colorierte REM Abbildungen. *Dll* exprimierende Zellen rot und *en* exprimierende blau, Zellen die beide Gene exprimieren pink markiert (nur A, B, D, F). (A) Frühes Stadium von *Orchestia cavimana* aus dem Pleonbereich. Die Zellreihen a und b sind gegenüber den Reihen c und d leicht abgesenkt. Im Pleonsegment PI1 heben sich Zellen der Reihe d und c zu der Beinknospe an. Die Mittellinie (ml) ist nach unten abgesenkt. (B) Späteres Stadium, anterior gelegener Thoraxbereich von *Orchestia cavimana*. Im Hinterrand des siebten Thoraxsegmentes bilden die hinteren Abkömmlinge der Reihe a mit den vorderen Abkömmlingen der Reihe b die Intersegmentalfurche (If). Die Beinknospen haben sich weiter angehoben. In der Mittellinie breiten sich die Zellen nach lateral aus und flachen sich anterioposterior ab. (C) Blick auf das Proctodaeum (pd). Lateral davon die zweiästigen Pleopoden (PI) und der einästige achte Thorakopod (Th8). (D) Pleonbereich von *Porcellio scaber*, frühe *en* und *Dll* Expression. Die Mittellinie ist gegenüber den anderen Zellen abgesenkt. Die *en* exprimierende Reihe a befindet sich in einer Ebene mit ihren Nachbarzellen. Die *Dll* exprimierenden Zellen haben sich im zweiten Pleopoden noch nicht angehoben. Im ersten Pleopoden bilden sie bereits die Beinknospen. (E) Übersicht von *Orchestia cavimana* im Stadium der Thorakopodenbildung. Die Thorakopoden (Th) richten sich von medial nach lateral auf (Pfeilspitze). (F) Thoraxbereich von *Porcellio scaber*. Die Beinknospen umfassen nur ein kleinen auf die *Dll* exprimierenden Zellen beschränkten Bereich.

3.5 Zellablationsexperimente bei *Porcellio scaber*

Die Ablation der ET bei *Porcellio scaber*

Die ET wurden in einem Stadium ablatiert, in dem vier Reihen der ET-Derivate bereits abgegeben wurden. Ziel des Experiments war es, Erkenntnisse über die Regulation der Teilungen der ET zu gewinnen. Daher wurde überprüft, ob die Ablation der ET einer Körperhälfte Einfluss auf die Teilungen der anderen ET und ihrer Derivate hat. Ebenso konnte getestet werden, ob der geordnete Verlauf der Teilungen in den anterioren Reihen abhängig von den posterioren Reihen ist.

Ergebnis dieses Experiments war ein Keimstreif, dessen Körperhälfte, in der die ET ablatiert wurden, nicht gebildet wurde (Abb. 26). Die ET der anderen Körperhälfte teilten sich weiter in einer Teilungswelle von innen nach außen und gaben kleinere Zellen nach anterior ab (Abb. 26A, B). Die Derivate teilten sich nach drei Zellzyklen in Längsrichtung wie in einem intakten Keimstreif (Abb. 26B). Der Verlauf der Entwicklung im anterioren Bereich ist schwieriger zu interpretieren. Es fanden Längs- und Querteilungen in den Reihen statt. (Abb. 26B). Die Derivate der ET scheinen eine zweite Teilung in vier Reihen vollzogen zu haben und danach mit den differentiellen Teilungen begonnen zu haben. Ein Muster, wie es in einem nicht manipulierten Keimstreif gebildet wird, ist nicht zu erkennen (Abb. 26A, B). Auf der linken Körperseite, auf der die ET ablatiert wurden, befinden sich vereinzelte Zellen. Die Reihen der vor der Ablation abgegebenen ET-Derivate und die anterior gelegenen Reihen nicht-ektoteloblastischen Ursprungs haben keine weiteren differentiellen Teilungen vollzogen (Abb. 26A, C). Die entsprechenden Zellen auf der rechten Körperhälfte zeigten den Beginn von differentiellen Teilungen, die keinem erkennbaren Muster folgten (Abb. 26C).

Die Teilungen der ET in einer Teilungswelle von innen nach außen sind unabhängig von den Zellen der anderen Körperhälfte. Auch die weitere Teilung der nach anterior abgegebenen ET-Derivate erfolgt unabhängig von der anderen Körperseite. Die differentiellen Teilungen der Reihen und die regelmässige Anordnung unter Beibehaltung der Zellabstände ist gestört.

Die Zellteilungen der anterioren Reihen des Keimstreifs sind abhängig von der Anwesenheit der posterior gelegenen. Sind diese nicht mehr vorhanden, teilen sich die Zellen nicht mehr.

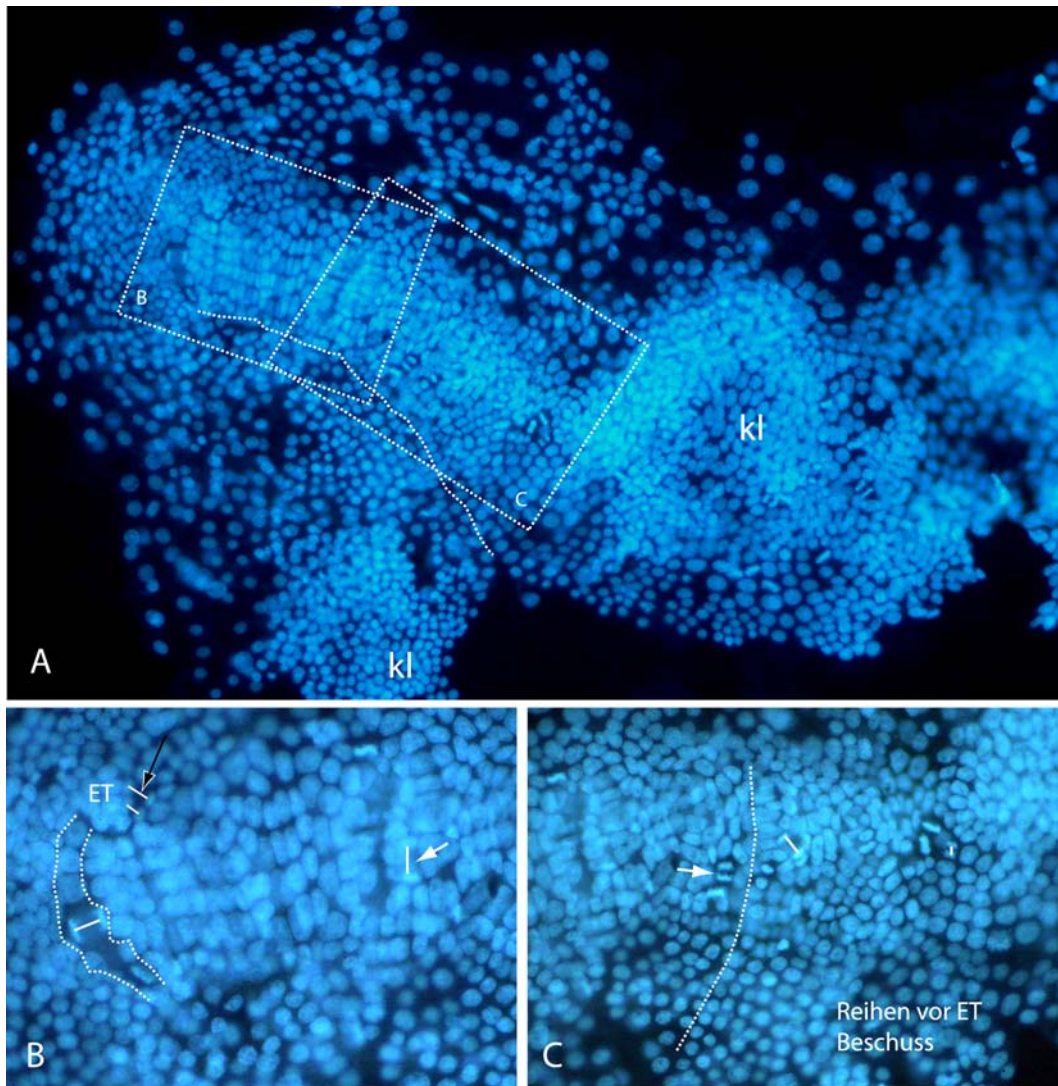



Abb. 26: Keimstreif von *Porcellio scaber* ca. 36 h nach Laserablation der ET der rechten Körperhälfte im Stadium der Abgabe der dritten e-Reihe. Hoechstfärbung. (A) Gesamter Keimstreif. Anterior befinden sich die Kopflappen (kl). Die Mittellinie ist durch die gestrichelte Linie markiert. Die linke Körperhälfte wurde nicht gebildet, die rechte Körperhälfte besitzt Zellen in Reihenanordnung. Die gestrichelten Kästen markieren die Ausschnittbereiche von (B) und (C). (B) Posteriorer Ausschnitt von (A). Die ET der rechten Körperhälfte (durch gestrichelte Linie eingegrenzt) geben weiter Derivate nach anterior ab. Die Derivate teilen sich im regulären Rhythmus in Längsrichtung weiter (schwarzer Pfeil). Die Reihenanordnung ist gestört. In den anterior gelegenen Reihen finden Querteilungen von Zellen statt (Pfeil). (C) Anteriorer Ausschnitt von (A). Die gestrichelte Linie markiert die posteriore Grenze der vorhandenen Reihen vor der Ablation der ET. Die Zellen anterior weisen kein Zellteilungsmuster auf. Auf der rechten Körperhälfte sind Zellteilungen in verschiedene Richtung sichtbar (Pfeil und Balken).

Die Ablation der Zelle d_3 bei *Porcellio scaber*

Zum Zeitpunkt des Beginns der differentiellen Teilungen in der Zelle d_1 wurde die Zelle d_3 auf einer Körperseite ablatiert (Abb. 27A). Sie spielt in der Beinmorphogenese eine wichtige Rolle. Sie ist die erste Zelle die *Dll* exprimiert und die Abkömmlinge der lateralen Tochterzelle d_{3e} bilden später die Beinspitze.

Ziel des Experimentes war, zu überprüfen, ob benachbarte Zellen das Schicksal dieser Zelle nach dem Zelltod übernehmen können oder ob die Determination bzw. Regulation innerhalb des Keimstreifs schon so weit fortgeschritten ist, dass Missbildungen entstehen, bzw. die Entwicklung gestoppt wird. Die rechte Körperseite dient als Kontrolle.

Nach der Ablation der Zelle d_3 auf der rechten Körperseite, verlief die Entwicklung zunächst normal (Aufnahme 5  Aufnahme5.avi). Alle Zellteilungen folgten der normalen Teilungsrichtung. Die differentiellen Teilungen im posterior gelegenen Segment erfolgten in dem regulären Muster. Die an die ablatierte Zelle angrenzende Zelle d_2 teilte sich normal (Abb. 27B).

Die erste beobachtete Veränderung zu der Normalentwicklung war das Aussetzen der Teilung der ablatierten Zelle d_3 gegenüber der anderen Körperseite (Abb. 27C). Die lateral liegende Zelle d_4 blieb in der Metaphase und teilte sich nicht. Die Zelle d_4 auf der anderen Seite hat sich zu diesem Zeitpunkt schon geteilt. Im weiteren Verlauf der Entwicklung traten immer mehr Zellen in die Metaphase ein, stoppten allerdings an diesem Punkt des Zellzyklus (Abb. 27D). Dies trifft sowohl für die Zellen der Mittellinie, als auch für Zellen der nicht-ablatierten Keimstreifhälfte zu. Die gesamte Entwicklung des Embryos verzögerte sich ab dem Zeitpunkt, an dem sich die Zelle d_3 teilen sollte. Der zeitliche Verlauf der Entwicklung stimmte bis zu dem Stadium welches in Abb. 27B gezeigt ist mit dem eines nichtmanipulierten Embryos überein (siehe Tab. 5 für den unmanipulierten Embryo). Die Teilung der Zelle a_1 in dem manipulierten Embryo ist um 4,5 h verzögert (Tab. 5, Abb. 27). Zu diesem Zeitpunkt führt ein normaler Entwicklungsverlauf zu der zweiten differentiellen Teilung der Zelle d_2 e. Im anterior gelegenen Segment teilten sich die Zellen in der normalen Zeit, stoppten nach Ausbleiben der Teilung von Zelle d_3 ebenfalls in der Metaphase.

Zum Zeitpunkt der differentiellen Teilungen sind die Teilungen innerhalb einer genealogischen Einheit voneinander Abhängig. Ebenso entsteht zu diesem Zeitpunkt die Abhängigkeit der einen Körperhälfte von der anderen. Die anterioren Reihen stehen in Abhängigkeit von den posterior gelegenen Segmenten. Dies lässt sich zumindest für die Zelle d_3 postulieren. Die Regulation der Zellteilungen erfolgt bei *Porcellio scaber* über einen Checkpoint während der Metaphase, da alle Zellen den Zellteilungszyklus bis zu diesem Punkt eingeleitet haben, aber in diesem Stadium stoppten.

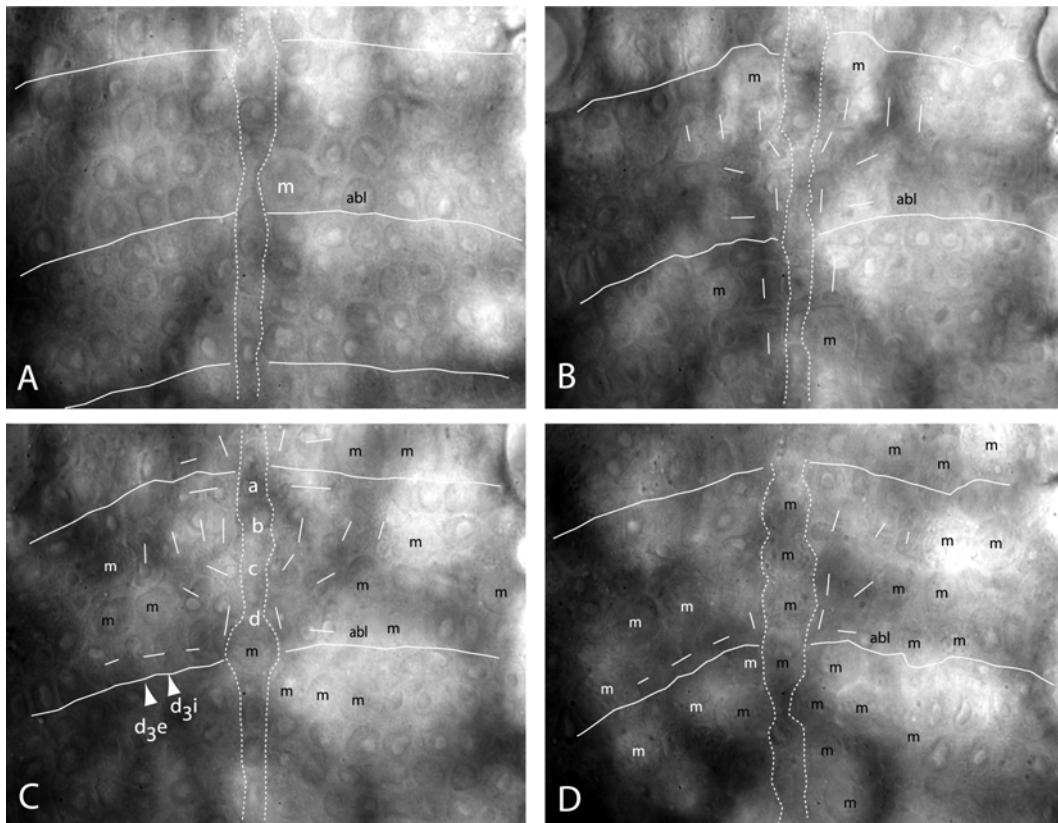


Abb. 27: **Laserablation der Zelle d_3 im vierten Thoraxsegment bei *Porcellio scaber*.** Abbildungen aus der Aufnahme des Keimstreifs nach Ablation der Zelle d_3 der rechten Körperhälfte. Die genealogischen Grenzen sind mit durchgehenden Linien markiert, die Mittellinie ist durch die gestrichelten Linien eingegrenzt. Zellen in Metaphase sind mit „m“ markiert. (A) Zeitpunkt der Ablation von d_3 (abl) auf der rechten Körperseite. Die Zelle d_1 ist in Metaphase. (B) Gleicher Keimstreif 5,5 h später. Die Zelle a_1 ist in beiden Körperhälften in Metaphase, bereits geteilte Zellen sind mit einem Balken verbunden. Die Zellen der posterior gelegenen genealogischen Einheit haben mit den differentiellen Teilungen begonnen. (C) Gleicher Keimstreif zum Zeitpunkt der letzten abgeschlossenen Zellteilung in diesem Bereich 7,5 h nach Ablation der Zelle d_3 . Auf der rechten Körperseite haben sich die Zellen d_3 und d_4 bereits geteilt. Auf der linken Seite befindet sich die Zelle d_4 in Metaphase. Die Zellen d_3 und d_4 im anterioren Segment sind ebenfalls in Metaphase. (D) Gleicher Keimstreif 12 h nach Ablation der Zelle d_3 . Es befinden sich 26 Zellen in dem sichtbaren Bereich in Metaphase. Die Metaphaseplatte ist entsprechend der normalerweise folgenden Teilungsrichtung ausgerichtet. Keine dieser Zellen führte eine reguläre Teilung durch. Der Embryo starb drei Stunden später.

4 Diskussion

4.1 Die Bildung und Differenzierung der Reihen nicht-ektoteloblastischen Ursprungs

Bei den auf ihre Zellgenealogie im postnauplialen Keimstreif untersuchten Taxa der Peracarida (Isopoda (Hahnenkamp 1974; Vehling 1994), Tanaidacea (Dohle 1972), Cumacea (Dohle 1970, 1976a) und Mysidacea (Scholtz 1984)) wurden anterior der ersten ET-Derivaten Reihen von Zellen beobachtet, die sich an der Bildung der vorderen postnauplialen Segmente der beiden Maxillen und des ersten Thorakopoden beteiligen. Nur bei den untersuchten Amphipoda sind alle Reihen aufgrund der fehlenden ET nicht-ektoteloblastischen Ursprungs (Scholtz 1990). Außerhalb der Peracarida wurden bei dem Decapoden *Cherax destructor* ebenfalls Zellreihen, die nicht-ektoteloblastischen Ursprungs sind, beobachtet (Scholtz 1992). Aus diesen Zellreihen werden später die Reihen E(2), E(3) und E(1) sowie in manchen Fällen die Reihe E(0). Bei den Cumacea, Mysidacea und Amphipoda bilden sich diese Reihen aus der Anordnung von Zellen, die aus keinem gleichmäßigen Teilungsmuster entstanden sind (Abb. 28), (Dohle 1970, 1976a; Scholtz 1984). Für die Tanaidacee *Leptochelia* berichtet Dohle (1972), dass die Reihen E(2) und E(3) aus einer Reihe B durch Längsteilung entstehen, die Reihen E(0) und E(1) aus einer Reihe A (Abb. 28).

Die Angaben zur Reihenbildung bei Isopoden sind widersprüchlich: Hahnenkamp (1974) konnte die Entstehung der Reihen nicht aufklären, beschreibt aber, dass sich vier Zellreihen, die er mit (1), (2) α , (2) β und (3) bezeichnet, vor den ET-Derivaten befinden. Nach seinen Beobachtungen entsteht aus Reihe (3) nach zwei Teilungen eine genealogische Einheit und Reihe (2) α und (2) β bilden zusammen ebenfalls eine genealogische Einheit. Vehling (1994) berichtet von zwei Zellreihen A und B, die sich vor den ET-Derivaten befinden. Die Teilung der Reihe B in die Reihen E(2) und E(3) wurde von ihm beobachtet. Ob eine Teilung der Reihe A in zwei Reihen stattfindet bleibt unklar, obwohl einzelne Mitosen darauf hindeuten. Vehling bezeichnet diese Reihen mit A1 und A2. Er beschreibt weiter

eine Teilung der Reihe A2, deren Resultat er als A2.1 und E(1) bezeichnet. Später teilt sich E(1) nach seiner Beobachtung nochmals, was allerdings nicht belegt wird.

Durch die Anwendung der 4D-Mikroskopie ist nun die Rekonstruktion der Zellgenealogie in diesem Bereich bei einem Vertreter der Isopoden gelungen. Tatsächlich liegen bei *Porcellio scaber* vor den ET Zellen, die sich nach der Abgabe der ersten e-Derivate der ET alle in Längsrichtung teilen und deren Abkömmlinge sich in vier hintereinander liegenden Reihen von Zellen anordnen (Abb. 28). Die ursprünglichen Reihen können somit mit A und B bezeichnet werden. In der von Dohle (1972) beschriebenen Tanaidacee *Leptochelia* verhalten sich die Reihen genauso wie in *Porcellio scaber* (Abb. 28). Die Teilung der Reihen A und B erfolgt bei *Porcellio scaber* jedoch viel früher als bei *Leptochelia*, bei der sich die Reihen erst während der Abgabe der Reihe eIV teilen. Zudem teilen sich bei *Porcellio scaber* die Reihen zeitgleich, während bei *Leptochelia* sich die Reihe B deutlich vor der Reihe A teilt (Dohle 1972). Die relativ frühe Teilung der Reihen A und B während der Abgabe der Reihe eII bei *Porcellio scaber* ist als Heterochronie zu interpretieren.

Bei keinem anderen untersuchten Peracariden ausserhalb der Isopoden und Tanaidaceen entstehen die vier Reihen E(0), E(1), E(2) und E(3) aus der Teilung von zwei Reihen A und B, sondern formieren sich aus ungeordneten Zellen (Abb. 28). Somit kann die Bildung der vier Reihen vor den ET-Derivaten aus zwei Reihen A und B, als eine Synapomorphie für ein Schwestergruppenverhältnis zwischen Tanaidacea und Isopoda herangezogen werden.

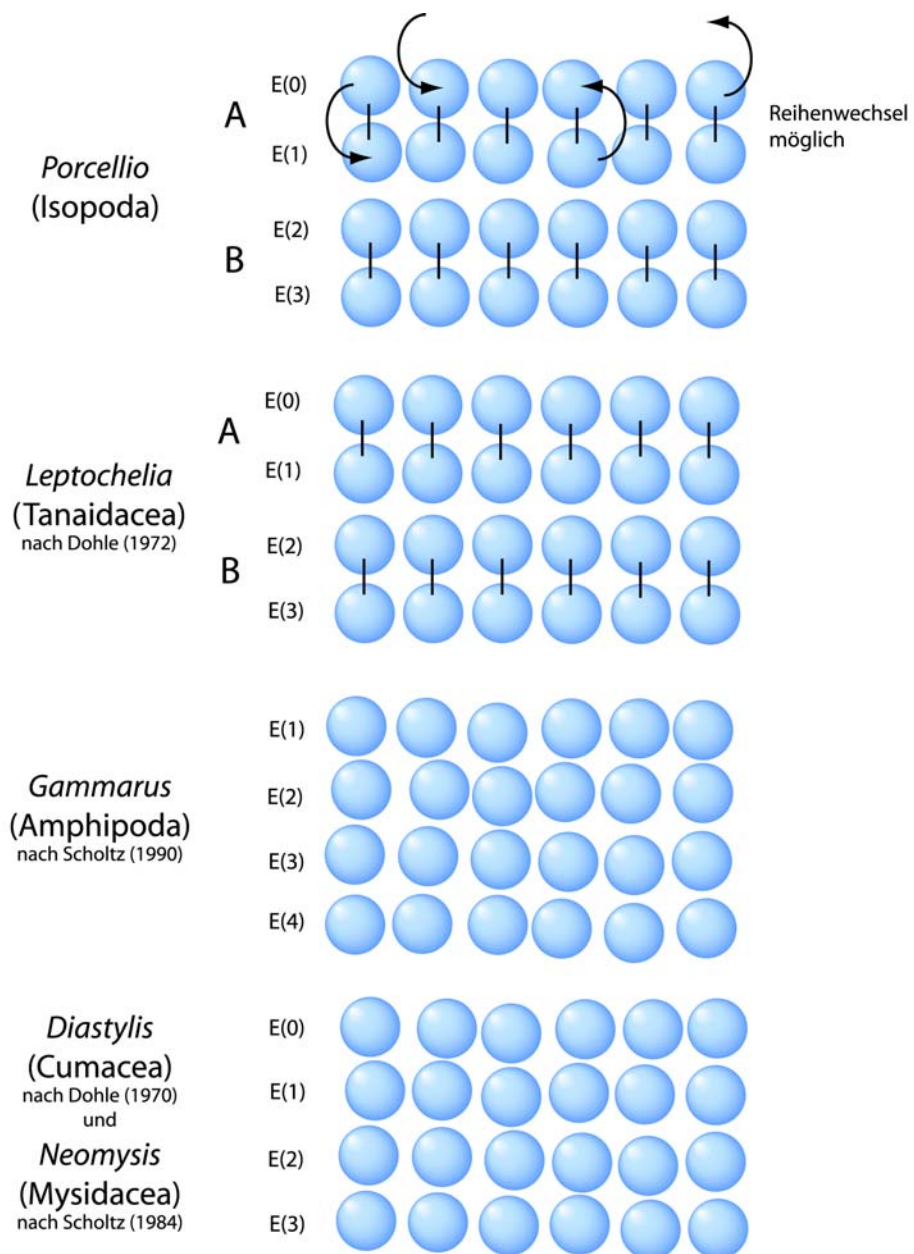


Abb. 28: **Bildung der Reihen nicht-ektoteloblastischen Ursprungs bei den daraufhin untersuchten Peracarida.** Bei *Porcellio scaber* bilden sich die vier Reihen E(0), E(1), E(2) und E(3) aus den zwei Zellreihen A und B. In den Tochterreihen der Reihe A können sich Zellen auch umordnen, die Positionen sind nicht streng determiniert. Bei den Tanaidacea erfolgt die Bildung auf die gleiche Weise, allerdings wurde hier kein Positionswechsel innerhalb der vorderen Reihen beobachtet (Dohle 1972). Bei Amphipoden ordnen sich die Reihen aus verstreuten Zellen an, dies gilt ebenfalls für die posterioren Reihen des Keimstreifs (z.B. E(4) usw.). Eine Reihe E(0) ist hier nicht beschrieben (Scholtz 1990). Bei den Cumacea und Mysidacea bilden sich die vier Reihen aus ungeordneten Zellen.

4.2 Zur Homologiefraage bezüglich der Reihen nicht-ektoteloblastischen Ursprungs bei den Peracarida

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Teilungen der vor den ET-Derivaten gelegenen Reihen A und B bei *Porcellio scaber* die Bildung von vier

Zellreihen zur Folge hat. Die hinteren beiden Reihen, Reihe E(2) und E(3), bilden jeweils durch zwei Teilungen je eine genealogische Einheit, die sich aus den Reihen a, b, c und d zusammensetzt. Die Zellen dieser vier Reihen teilen sich nach dem differentiellen Zellteilungsmuster der posterioren genealogischen Einheiten. In allen bisher auf die Zellgenealogie untersuchten Peracarida findet man die beiden Reihen E(2) und E(3), wobei diese nur bei den Tanaidaceen und Isopoden aus einer Zellreihe durch Längsteilung entstehen (Abb. 28) (Dohle 1972, 1976a; Scholtz 1984; Scholtz 1990). Trotz der von diesem Modus abweichenden Entstehung der Reihen E(0) bis E(3) durch Zellanordnung bei den anderen untersuchten Peracarida, können diese beiden Zellreihen als homolog betrachtet werden. Als Argumente hierfür können ihre Lage und ihre weitere Entwicklung zu dem Hinterrand der ersten Maxille bis zum vorderen Bereich des ersten Thorakopoden herangezogen werden.

Zwischen den detaillierten Analysen der Reihenbildung bei den Peracarida (Dohle 1970, 1972, 1976a; Scholtz 1984; Scholtz 1990) und dem Decapoden *Cherax* (Scholtz 1992) kommt es zu divergierenden Bezeichnungen der vor den Reihen E(2) und E(3) gelegenen Zellreihen (Abb. 29). Die Bezeichnung richtet sich einerseits nach der Genealogie, so bei Dohle (1972), in dessen Arbeit die Reihe E(1) bei *Leptochelia* als der hintere Abkömmling der Reihe A und die Reihe E(0) als der vordere Abkömmling definiert ist (Abb. 28). In den Arbeiten über die Peracariden, in denen sich die Reihen aus ungeordneten Zellen formieren, werden die beiden Reihen vor der Reihe E(2) mit E(1) und E(0) von posterior nach anterior benannt (Abb. 28) (Dohle 1970; Scholtz 1984). Bei den Amphipoden wird die Reihe hinter der Mandibel mit E(1) bezeichnet (Scholtz 1990).

Im weiteren Entwicklungsverlauf bilden alle untersuchten Peracarida und auch der Decapode *Cherax* aus Zellen der Reihe E(1) den vorderen Teil der ersten Maxille (Dohle 1970, 1972, 1976a; Scholtz 1984; Scholtz 1990; Scholtz 1992). Die beiden Zellreihen, die diesen Teil der Maxille bilden, vollziehen bei allen Peracariden ein stark übereinstimmendes Teilungsmuster, welches zunächst aus Querteilungen nahezu aller Zellen besteht (Abb. 29).

Bei den Arten der Peracarida, bei denen die *en* Expression der Zellen in diesem Bereich untersucht wurde, bleiben die Zellreihen zwischen den Zellen der Reihe E(2)a und dem *en* exprimierenden Bereich des Mandibelsegmentes En negativ (Scholtz et al. 1993; Scholtz et al. 1994; Dohle und Scholtz 1995; Scholtz und Dohle 1996). Bei Mysidaceen und Amphipoden befinden sich, bevor die differentiellen Teilungen in den Reihen E(2) und E(3) beginnen, vier Reihen von Zellen, die nicht *en*

exprimieren. Diese Reihen werden in Mysidaceen aus den Reihen E(0) und E(1) gebildet, bei Amphipoden aus der Reihe E(1) (Abb. 28) (Scholtz 1984; Scholtz 1990).

Bei dem hier untersuchten Isopoden *Porcellio scaber* findet man zum Zeitpunkt der differentiellen Teilungen in den posterioren Reihen ebenfalls vier Zellreihen zwischen der *en* exprimierenden Reihe E(2)a und dem En positiven Hinterrand des Mandibelsegmentes (Abb. 29). Diese vier Reihen entstehen aus der Reihe E(1) und entsprechen den vier Zellreihen, die bei den Tanaidaceen aus der Reihe E(1) entstehen (Dohle 1972). Das Teilungsmuster der hinteren Abkömmlinge der Reihe E(1) bei *Porcellio scaber* stimmt mit dem Teilungsmuster der beiden als E(1) bezeichneten Reihen der Cumacea und Mysidacea weitgehend überein (Abb. 29): Alle Zellen vollziehen zunächst Querteilungen. Betrachtet man den Zeitpunkt, an dem die Reihe E(0) bei der Cumacee *Diastylis* und bei der Mysidacee *Neomysis* erkennbar wird, erfolgt dies ungefähr während der Abgabe der vierten ET-Derivate (Dohle 1970; Scholtz 1984). Dies ist der gleiche Zeitpunkt an dem sich bei *Porcellio scaber* die Reihe E(1) teilt und dadurch die beiden Reihen gebildet werden, die den Reihen E(0) und E(1) entsprechen.

Die Übereinstimmungen im Genexpressionsmuster und dem Teilungsmuster, sowie dem Resultat der weiteren Entwicklung sind ausreichend, um eine Homologie der Reihe E(1) der Tanaidacea, Amphipoda und Isopoda mit den Reihen E(0) und E(1) als Gesamtheit der Cumacea und Mysidacea anzunehmen.

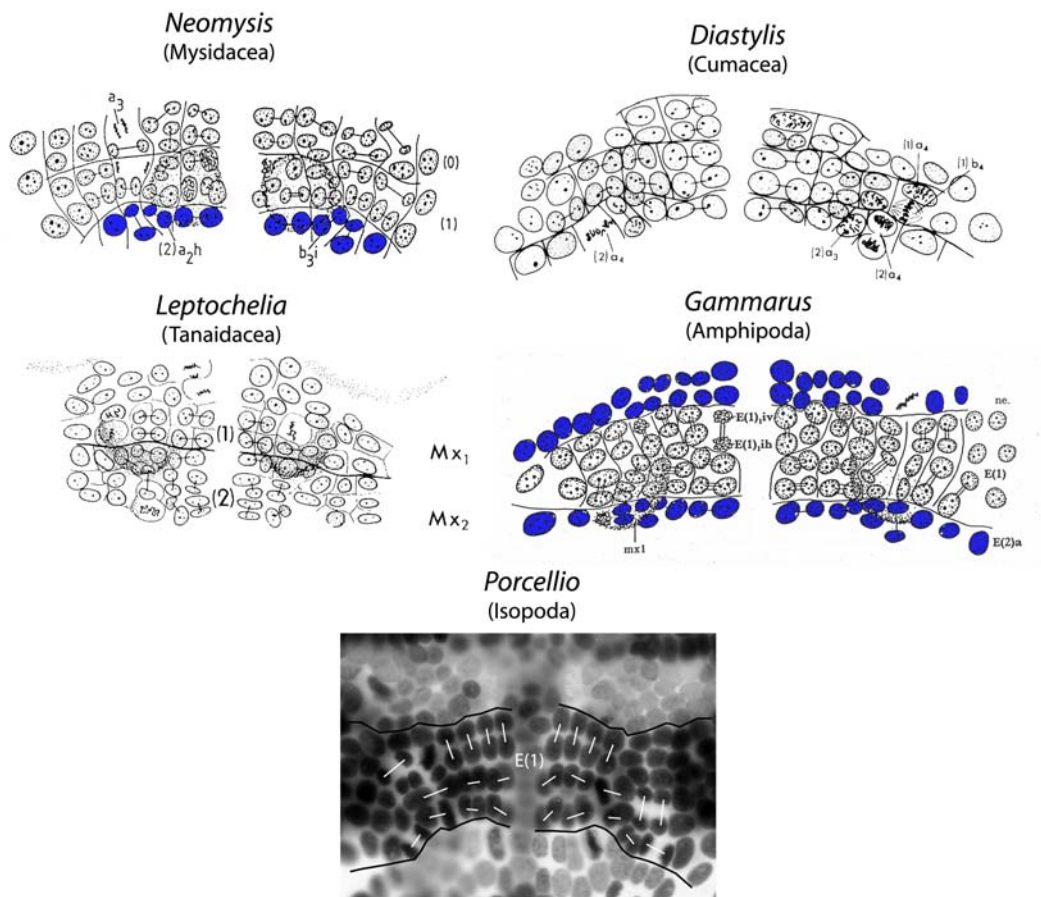


Abb. 29: Vergleich des Zellteilungsmusters der Reihen E(0) und E(1) zwischen den daraufhin untersuchten Peracarida. *Neomysis* (Mysidacea) (Scholtz 1984), *Diastylis* (Cumacea) (Dohle 1976a), *Leptochelia* (Tanaidacea) (Dohle 1972), *Gammarus* (Amphipoda) (Scholtz 1990) und *Porcellio* (Isopoda). Die posterioren zwei Reihen zeigen in allen Peracariden Querteilungen. In den beiden anterioren Reihen teilen sich die Zellen nach einem divergierendem Muster. Die *en* Expression ist, soweit bekannt, in die Zeichnungen blau eingetragen. Bei *Porcellio scaber* sind auf der Negativ-Abbildung die hellen Zellen En positiv.

4.3 Zellsortierung und Zelllinie in den Reihen E(0) und E(1)

Die Ergebnisse aus der 4D-Analyse der Zellgenealogie von *Porcellio scaber* zeigen, dass durch die Teilung der Reihe A die Tochterzellen zwar eine durch die Längsteilung definierte Position erhalten, bei der folgenden Teilung die Zellen ihre Position und die Reihe noch wechseln können. In *Porcellio scaber* findet im vorderen Bereich zwischen Mandibel und erster Maxille eine Zellsortierung statt (Abb. 28).

Bei den Tanaidaceen, bei denen die Zellreihen E(0) und E(1) auch durch Teilung einer Mutterreihe A entstehen, sind die Verhältnisse geordneter (Dohle 1972). Hier wurden keine Zellwanderungen beobachtet, ausser dem Verschieben der median gelegenen Zelle nach anterior (Dohle 1972).

Die weiteren Teilungen der Zellen der Reihe E(0) bei *Porcellio scaber* sind nicht bilateralsymmetrisch bezüglich ihrer Teilungsrichtungen. Ebenso findet man bei *Porcellio scaber* im Mittellinienbereich, dass die Zellen von lateralen Zellen abstammen, dieses Muster ebenfalls nicht bilateralsymmetrisch ist.

Dieses Phänomen der Zellsortierung und darauf folgenden Zellanordnung in die Reihe E(1), entspricht wohl dem Anordnungsprozess, wie er bei Cumaceen und Mysidaceen beobachtet wurde, bei denen die Reihen E(0) und E(1) nicht durch Teilung einer Mutterreihe entstehen (Dohle 1970; Scholtz 1984). Dieser ordnende Faktor wird bei *Porcellio scaber* erst nach den Teilungen aktiv und ermöglicht dadurch die Zellverlagerungen zwischen den Reihen.

Die beiden medianen Zelle die nach der Teilung der Reihen E(2) und E(3), sich aus dem Zellverband lösen und in den Keimstreifen einwandern zeigen ebenfalls eine anfängliche Variabilität der Zellidentität. Das Einwandern von zwei Zellen nebeneinanderliegenden Zellen von dreien, entspricht nicht einem bilateralen Muster, wie es später in dem Bereich zu finden ist. Die Funktion dieser Zellen bleibt unklar. Es könnten Neuroblasten sein, wobei bei Krebsen noch nie einwandernde Neuroblasten beobachtet wurden. Einwandernde Neuroblasten findet man nur bei Insekten.

Unregelmässigkeiten sind bei *Porcellio scaber* aber auch im Genexpressionsmuster von *en* zu beobachten. Zwischen den Präparaten ist das Muster nicht identisch und die *en* Expression wird nach anterior aus den Abkömmlingen der Reihe E(1) verdrängt. Hier könnte auch ein ordnender Faktor aktiv sein, der die Expression von *en* nachreguliert. Bei anderen auf ihre *en* Expression in diesem Bereich untersuchten Peracariden *Neomysis* und *Gammarus* sind solche Unregelmässigkeiten nicht beobachtet worden (Scholtz und Dohle 1996; Dohle und Scholtz 1997).

Die Ursache für die bei *Porcellio scaber* beobachtete Zellsortierung und Regulierung des Expressionsmusters liegt wahrscheinlich in der relativ frühen Entstehung der Zellen durch Teilung der Reihen A und B. Diese teilen sich nach der Abgabe der ersten ET-Derivate. Die *en* Expression beginnt zum gleichen Zeitpunkt. Bei Tanaidaceen finden die Teilungen der Reihe A und B nacheinander und viel später, während der Abgabe der vierten ET-Derivate, statt (Dohle 1972). Bei ihnen erhalten die Zellen ihre Position durch die Längsteilung der Reihen und es ist zu erwarten, dass bei ihnen das *en* Expressionsmuster viel geordneter ist.

4.4 Das Gen *en* Expression in *Orchestia cavimana* und *Porcellio scaber*

Der erste Hinweis auf die Funktion von *En* bei der Festlegung der A/P-Achse innerhalb der Segmente von *Drosophila melanogaster* kam von Garcia-Bellido und Santamaria (1972). Im Zuge der vergleichenden Untersuchungen wurde bis jetzt die Expression des Gens *en* innerhalb der Arthropoden bereits bei Insekten, Krebsen und Spinnentieren untersucht (siehe Patel et al. 1989a; Patel et al. 1989b; Manzanares et al. 1993; Scholtz et al. 1993; Scholtz et al. 1994; Scholtz und Dohle 1996; Telford und Thomas 1998; Queinnec et al. 1999; Damen et al. 2000). Die Ergebnisse zeigen ein konserviertes Expressionsmuster von *en* innerhalb der posterioren Grenze eines Segmentes. Die vordere Grenze der *en* Expression dient zudem nicht nur der Determination des Zellschicksals, sondern auch der Bildung einer Grenze, an der die Positionsinformation für weitere morphogenetische Prozesse genutzt werden kann (Meinhardt 1983; Basler und Struhl 1994). Untersuchungen des Expressionsmusters in Onychophoren (Wedeen et al. 1997) ergaben, dass hier zwar *en* ausschließlich im Mesoderm exprimiert wird, das Muster aber dennoch segmental ist.

In Hinblick auf die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Artikulaten wurden die Ergebnisse bei Arthropoden mit denen von Anneliden verglichen. Untersuchungen der *en* Expressionsmuster bei Polychaeten (Seaver et al. 2001) und Egel (Shain et al. 2000; Seaver et al. 2001) konnten innerhalb der Anneliden eine Expression von *en* während der Segmentierung und Neurogenese nicht bestätigen. Dies könnte auf eine konvergente Entstehung der Segmentierung bei Anneliden und Arthropoden hinweisen. In Bezug auf die Ecdysozoa-Hypothese, die ein Schwestergruppenverhältnis zwischen Cycloneuralia und Arthropoden postuliert, fehlen Untersuchungen innerhalb der hypothetisierten Schwestergruppen, z.B. bei dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* über die Funktion von Produkten orthologer *en* Gene, obwohl *en* Gene bereits gefunden wurden (*C. elegans*: GenBank Accession NM_066497).

Innerhalb der Arthropoden haben zudem mehrfach unabhängig voneinander in verschiedenen Taxa Duplikationen des Gens *en* stattgefunden (Coleman et al. 1987; Hui et al. 1992; Gibert et al. 1997; Peterson et al. 1998; Abzhanov und Kaufman 2000). Dies erschwert die Analyse des *en* Expressionsmusters mit Antikörpern, wobei jedoch festgestellt wurde, dass der in der vorliegenden Arbeit verwendete

monoklonale Antikörper 4D9 beide Produkte der paralogen *en* Gene *Ps-en1* und *Ps-en2* von *Porcellio scaber* detektiert (Abzhanov und Kaufman 2000).

4.5 Vergleich des Expressionsmusters von *en* mit dem anderer Krebse

Vergleicht man den Beginn der *en* Expression bei *Porcellio scaber* mit dem bei anderen untersuchten Malakostraken, gleicht das zeitliche Muster dem von Decapoden und Mysidaceen. Es ist bereits eine Expression in der Reihe ab zu finden, während die Reihe cd *En* negativ ist. Eine *En* positive Zellreihe wechselt also mit einer *En* negativen. Bei Amphipoden beginnt die *en* Expression erst, wenn sich die Zellreihe ab geteilt hat, niemals vorher. Dieser zeitliche Unterschied wird auch im Zusammenhang der Bildung der Intersegmentalfurche und der *en* Expression deutlich. Während bei *Porcellio scaber* das Absenken der *En* positiven Zellen zeitlich nicht mit dem Beginn der Expression korreliert, senken sich in Amphipoden die Zellen schon ab, sobald sie *en* exprimieren.

Es ist also anzunehmen, dass der frühe Beginn der *en* Expression vor der Teilung der Reihe ab zum Grundmuster der Peracarida gehört, während der Verlauf bei Amphipoden abgeleitet ist.

4.6 Die Expression des Gens *en* bei der Segmentierung des Keimstreifs

Das Expressionsmuster von *en* bei *Porcellio scaber* deutet auf eine Funktion bei der Determination des posterioren Schicksals *en* exprimierender Zellen innerhalb jedes Segments hin. Da zumindest bei *Porcellio scaber* die *Dll* Expression an der anterior zum *En*-Streifen gelegenen Zelle d₃ beginnt, dient die anteriore Grenze der *en* Expression wahrscheinlich der Festlegung der Positionsinformation für die Beinentwicklung. Dieses Phänomen stimmt mit der Theorie über die Kompartimentgrenzen als wichtige Organisatoren von Positionsinformationen überein (Morata und Lawrence 1975; Meinhardt 1983; Dahmann und Basler 1999).

4.7 Wird die *Dll* Expression durch die Zelllinie kontrolliert?

Der Beginn der *Dll* Expression in jedem Segment des postnauplialen Keimstreifs in der Zelle d_3 suggeriert eine Abhängigkeit der Expression von der Zelllinie. Betrachtet man allerdings das Expressionsmuster genauer, kann für die *Dll* Expression bei *Porcellio scaber* und *Orchestia cavimana* bezüglich der Zelllinienabhängigkeit das gleiche postuliert werden, wie schon für die *en* Expression in früheren Arbeiten bei anderen Malakostraken festgestellt wurde (Scholtz et al. 1993; Scholtz et al. 1994; Dohle und Scholtz 1995; Scholtz und Dohle 1996). Die Expression von *Dll* im Keimstreif der Malakostraka ist unabhängig von der zugrunde liegenden Zelllinie. Folgende Argumente können aus den Ergebnissen dafür herangezogen werden:

- a) Die Expression des Gens *Dll* findet im nauplialen Bereich, in dem keine Zelllinie zu finden ist, eine ähnliche Ausprägung wie im postnauplialen Bereich mit charakteristischer Zelllinie.
- b) Bei beiden untersuchten Arten beginnt die *Dll* Expression zu einem unterschiedlichen Entwicklungsstadium der Zelllinie: Bei *Porcellio scaber* zu Beginn der ersten differentiellen Teilungen, bei *Orchestia cavimana* ungefähr einen Zellzyklus früher, kurz nach Teilung der Reihen ab und cd.
- c) Das Ausweiten des Feldes von *Dll* positiven Zellen erfolgt durch zwei Mechanismen: einerseits durch klonale Weitergabe der Expression an Tochterzellen, andererseits durch Neubeginn der *Dll* Expression in an das Feld angrenzende Zellen.
- d) *Dll* exprimierende Zellen können die Expression wieder stoppen. Dies findet bei beiden untersuchten Arten im inneren Abkömmling der Zelle d_3 statt. Ebenso ist bei *Orchestia cavimana* ein Verlust der *Dll* Expression in Zellen des lateralen Bereichs innerhalb der Thoraxsegmente zu beobachten.
- e) Bei beiden Arten beginnt die *Dll* Expression im postnauplialen Bereich des Keimstreifs in der Zelle d_3 unabhängig davon, ob der Keimstreif von Ektoteloblasten gebildet wird, wie bei *Porcellio scaber*, oder aus sich anordnenden Zellen gebildet wird, wie bei *Orchestia cavimana*.
- f) Das *Dll* Expressionsmuster unterscheidet sich zwischen den Extremitäten im Thorax und im Pleon, obwohl in beiden Bereichen die gleiche Zelllinie zugrunde liegt.

Die aufgeführten Punkte zeigen deutlich die Dynamik des Expressionsmusters von *Dll* im postnauplialen Keimstreif bei malakostraken Krebsen und belegen, dass

das Zellteilungsmuster keinen Einfluss auf das Expressionsmuster hat. Die Frage, warum innerhalb der Malakostraken dieses stereotype Zellteilungsmuster evolviert wurde, bleibt also weiterhin offen.

4.8 Die Evolution eines einästigen Beines

Da für das Grundmuster der Peracarida ein zweiästiges Bein, bestehend aus Endo- und Exopodit, anzunehmen ist und die Amphipoden und Isopoden nicht als Schwestergruppen anzusehen sind (Siewing 1951; Richter und Scholtz 2001), sind die einästigen Thorakopoden bei beiden Gruppen konvergent aus zweiästigen Thorakopoden entstanden. Bei Amphipoden und Isopoden bestehen die thorakalen Stabbeine aus den Endopoditen. Demzufolge muss zweimal unabhängig die Unterdrückung des Auswachsens des Exopoditen evolviert worden sein. In den Segmenten der beiden Vertreter ist das Muster der differentiellen Teilungen in den Thorakopoden und den Pleopoden weitgehend übereinstimmend. Unterschiede finden sich im Genexpressionsmuster des Gens *Dll* und innerhalb der morphogenetischen Prozesse.

Die Breite der Beinknospen von Amphipoden spiegelt sich auch in einem nach lateral ausgeweiteten Feld *Dll* positiver Zellen bei *Orchestia cavimana* wider (Abb. 30 und Abb. 31). Die kleinere Beinknospe von *Porcellio scaber* besitzt entsprechend dazu ein nur auf diesen Bereich beschränktes Feld von *Dll* positiven Zellen (Abb. 30). Ein Vergleich zwischen Thorakopoden und Pleopoden ergibt, dass das Auswachsen des Exopoditen im Thorax bei beiden Arten auf unterschiedliche Weise unterdrückt wird. Bei *Orchestia cavimana* wird die *Dll* Expression in den lateralen Zellen d_6 bis d_8 , sowie c_7h , a_6v und a_7v der Thoraxsegmente wieder ausgeschaltet (Abb. 30). Ein Abschalten der *Dll* Expression wurde bisher in keinem auf die *Dll* Expression untersuchten Organismus beobachtet. Aus den verbleibenden *Dll* positiven Zellen bildet sich die Beinspitze des Thorakopoden, die sich von innen nach lateral aufrichtet (Abb. 31). Später ist der Bereich des gesamten Telopoditen *Dll* positiv, während der proximale Coxopodit *Dll* negativ ist. Im Pleopoden exprimieren die *Dll* positiven Zellen durchgängig *Dll* und bilden den im Thorax fehlenden Exopoditen. Bei *Porcellio scaber* exprimieren im Thorax die lateral von d_5e gelegenen Zellen nicht *Dll* (Abb. 30). Hier wird die für das Auswachsen eines Exopoditen notwendige P/D-Achse nicht angelegt (Abb. 31).

Vergleicht man dieses Ergebnis mit anderen Untersuchungen an zweiästigen Thorakopoden innerhalb der Peracarida, zeigt sich, dass bei den Cumacea Klone der Zelle d_5 den Bereich der Beinknospe bilden, aus dem sich der Exopodit bildet (Dohle 1976a). Es ist aus den vorliegenden Ergebnissen anzunehmen, dass diese Zelle ebenfalls *Dll* exprimiert. *Dll* hat im frühen Stadium der Beinknospenbildung die Funktion die P/D-Achsen zu bilden. Da in der Mandibel von *Porcellio scaber* nur zu Beginn der Knospenbildung *Dll* exprimiert wird und danach wieder verloren geht, bleibt unklar, wie die Achse der Mandibel determiniert wird (Scholtz et al. 1998). Eine mögliche Lösung dieser Frage deutet sich an, wenn man unterschiedliche Funktionen von *Dll* während der Beinentwicklung annimmt. Eine frühe *Dll* Expression bewirkt die Determination der P/D-Achse, während *Dll* im weiteren Verlauf das Schicksal der distalen Zellen des Telopoditen festlegt (Gonzalez-Crespo und Morata 1996; Scholtz et al. 1998).

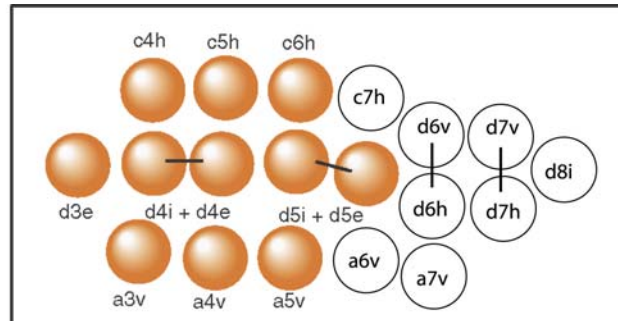
Die Determination der Beinsegmente des Telopoditen durch *Dll* scheint bei allen Arthropoden die Regel zu sein, obwohl in manchen untersuchten Arten *Dll* Expressionen in Teilen von Extremitäten beobachtet wurden, die nicht dem Telopoditen entsprechen (Panganiban et al. 1995; Scholtz et al. 1998; Williams 1998; Mittmann und Scholtz 2001). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen ebenfalls die Doppelfunktion von *Dll* bei der Extremitätenbildung: Zunächst wird die P/D-Achse durch die Expression von *Dll* festgelegt, danach wird durch *Dll* das Zellschicksal der distalen Zellen innerhalb des Telopoditen determiniert. Bei den beiden untersuchten Arten kommt der *Dll* Expression in Zelle d_{3e} für die Achsenbildung des Endopoditen und der *Dll* Expression in der Zelle d_5 für die Achsenbildung des Exopoditen die wichtige Funktion zu. Später ist die Coxa der zweiästigen und der einästigen Beine *Dll* negativ. Die Zellen, die bei zweiästigen Thorakopoden den Exopoditen bilden würden, beteiligen sich innerhalb der einästigen Thorakopoden an der Bildung der proximalen dorsalen Seite. Die genaue Zelllinie konnte jedoch nicht verfolgt werden.

Diese Unterschiede in der *Dll* Expression innerhalb der Thorakopoden können jedoch nicht als Gegenargument für ein Schwestergruppenverhältnis zwischen Amphipoden und Isopoden herangezogen werden, da möglich ist, dass der Zustand innerhalb der Amphipoden plesiomorph ist. In diesem Fall wäre anzunehmen, dass die frühe *Dll* Expression in den lateralen Zellen der Thorakopoden bei Amphipoden innerhalb der Isopoden vollständig verloren gegangen ist.

Einem Schwestergruppenverhältnis von Amphipoden und Isopoden widerspricht vielmehr die unterschiedliche Morphologie der Beinknospen und die Morphogenese der Beine. Die Thorakopoden der Isopoden wachsen nach oben aus, während sich die Thorakopoden der Amphipoden nach oben hin von innen nach außen aufrichten.

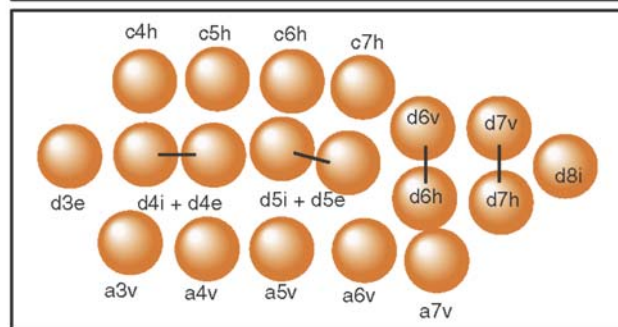
Orchestia cavimana

Thorakopod



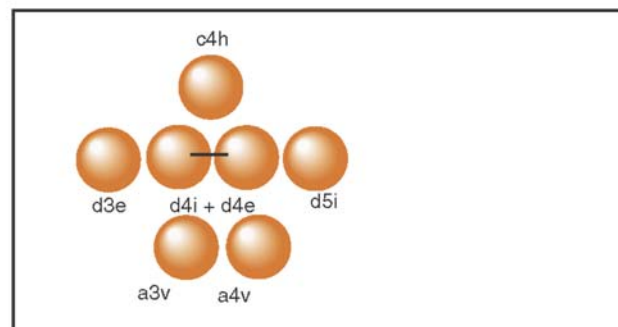
Orchestia cavimana

Pleopod



Porcellio scaber

Thorakopod



Porcellio scaber

Pleopod

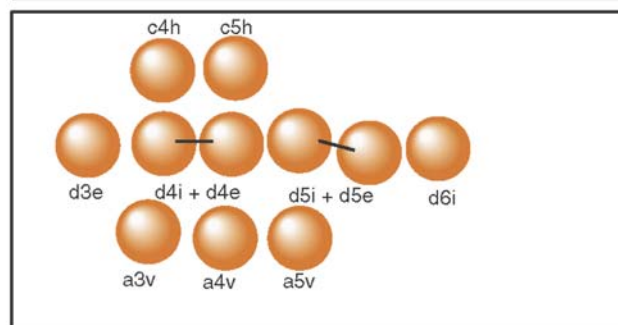


Abb. 30: **DII** exprimierende Zellen im Thorakopod und im Pleopod von *Orchestia cavimana* und *Porcellio scaber*. Im Thorakopod von *Orchestia cavimana* exprimieren zuerst die gleichen Zellen **DII** wie im Pleopod. Die lateralen Zellen schalten die **DII** Expression später wieder ab. Im Pleopod exprimieren diese Zellen weiter **DII**. Bei *Porcellio scaber* beginnen einige dieser Zellen nicht **DII** zu exprimieren. Im Pleopod von *Porcellio scaber* exprimieren die Zellen d_{3e} und d_{6i} **DII**. Diese bilden später den zweiten Ast des Pleopoden. Dieses Modell verdeutlicht die unterschiedlichen Wege, wie im Thorakopoden der beiden Arten die Entwicklung des Exopoditen unterdrückt wird.

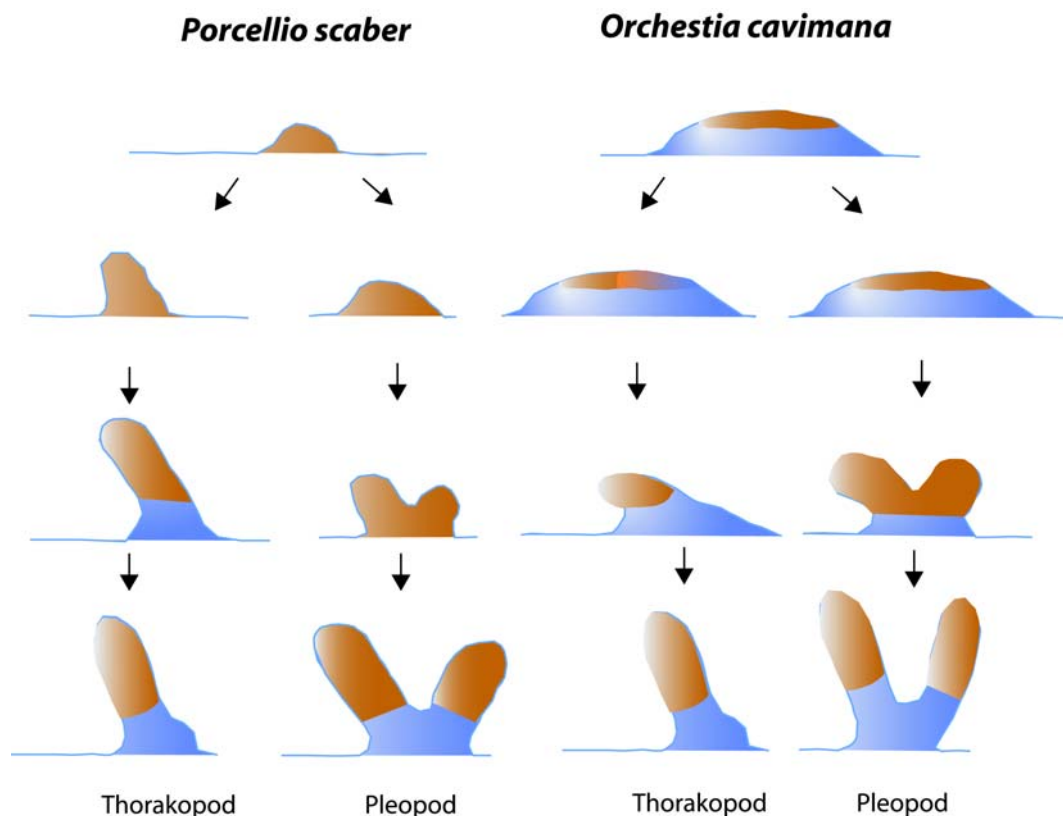


Abb. 31: Zusammenfassendes Modell der *Dll* Expression in den Thorakopoden und Pleopoden von *Orchestia cavimana* und *Porcellio scaber*. Die schmalere Beinknospe von *Porcellio scaber* wächst im Thorakopod ohne Verzweigung aus. Die Knospe im Pleopod ist etwas breiter und bildet eine zusätzliche Verzweigung, die den Exopoditen bildet. In *Orchestia cavimana* verliert im Thorakopod der laterale Bereich die *Dll* Expression. Das Bein richtet sich von innen nach außen auf. Im Pleopod von *Orchestia cavimana* bleibt der gesamte Bereich *Dll* positiv und es bildet sich aus diesem Bereich der Exopodit.

4.9 Wieviele Achsen hat ein Krebsbein?

Schram und Koenenmann (2001) stellen drei Modelle der Beinentwicklung innerhalb der Arthropoden zur Diskussion. Einerseits das „*Drosophila*“-Modell, welches durch eine deutliche P/D-Achse charakterisiert ist. Dies ist unabhängig davon, ob das Bein ein- oder zweiästig ist, somit werden auch die zweiästigen Beine von Mysidaceen hinzugezählt. Ein weiteres Modell umfasst die Entwicklung der Blattbeine von Branchiopoden und Cladoceren. In den Blattbeinen werden acht Loben gebildet und die *Dll* Expression ist variabel. Als ein drittes Modell wird die Entwicklung der Beins des Leptostracen *Nebalia* postuliert. Auf der Basis der Arbeit von Williams (1998) wird hier als Besonderheit ein Feld von zusätzlicher *Dll* Expression am Rand angeführt. Aufgrund der Erkenntnisse bezüglich der *Dll* Expression im Bereich von Sinnesborsten (Mittmann und Scholtz 2001; Williams et al. 2001) und dem Borstenmuster im Bein von *Nebalia* muss die *Dll* Expression eher

der Borstenentwicklung zugeordnet werden, als einer zusätzlichen P/D-Achsendetermination. Das Expressionsmuster von *Dll* im Bein von *Nebalia* rechtfertigt demzufolge nicht die Behandlung als eigener Typus, wie dies von Schram und Koenenmann (2001) vorgeschlagen wurde.

Bei *Nebalia* beginnt die *Dll* Expression in einem zusammenhängenden Feld von Zellen bevor sich dieses in zwei Loben trennt, die den Endo- und Exopoditen des Beins bilden (Williams 1998). Die anfängliche *Dll* Expression innerhalb eines Zellclusters bildet durch die Aufspaltung zwei separate P/D-Achsen. Dies entspricht weitgehend den Verhältnissen in den Pleopoden der in dieser Arbeit untersuchten Arten. Die postulierte Existenz von zwei P/D-Achsen im Krebsbein wird durch die Unterdrückung der lateralen Achse des Exopoditen in den Thorakopodenknospen der hier untersuchten Arten untermauert.

Ein ähnliches Phänomen der unterdrückten Exopoditenentwicklung wird von Olesen et al. (2001) für *Leptodora kindtii* beschrieben. Hier bleibt die Aufspaltung des Feldes *Dll* positiver Zellen an der distalen Spitze des Beins aus, eine Ausbildung des Exopoditen wird dadurch verhindert.

Diese Ergebnisse zusammengefasst, weisen Krebsbeine eine P/D-Hauptachse auf, die in die Spitze des Endopoditen reicht und durch die *Dll* Expression angelegt wird. Durch die Aufspaltung der *Dll* Expression an dieser Spitze kann während der Entwicklung eine zweite P/D-Achse angelegt werden, die das Auswachsen eines Exopoditen verursacht.

4.10 Die Regulation von *Dll* in *Orchestia cavimana* und *Porcellio scaber*

Die Analyse der Regulation von *Dll* bei der Taufliege *Drosophila melanogaster* hat ergeben, dass drei Signale für die Expression notwendig sind: Hedgehog (Hh), Wingless (Wg) und Decapentaplegic (Dpp) (Basler und Struhl 1994; Diaz-Benjumea et al. 1994). Hh steuert die Expression von *wg* und *dpp* und wird in En positiven Zellen exprimiert (Abb. 32). Bei *Drosophila* beginnt die *en* Expression als eine Antwort auf Fushi tarazu (Ftz) und Even-skipped (Eve). Diese Initiation der *en* Expression wird danach durch einen autoregulatorischen Prozess ersetzt, bei dem die Sekretion von Wg der angrenzenden Zellen für die Expression von *en* notwendig ist und dies wiederum die Expression von *wg* in den Nachbarzellen bedingt (Vincent und

O'Farrell 1992; Vincent und Lawrence 1994). Durch diesen Prozess wird die posterior/anterior Grenze des Segmentes und später auch des Beines etabliert. Wg aktiviert die Expression von *Dll* (Cohen 1990; Cohen et al. 1993). Bei *Drosophila* ist also eine Grenze von *ng/en* exprimierenden Zellen eine Notwendigkeit für die Aktivierung des Gens *Dll*. Der Ort und der Zeitpunkt der Expression von *Dll* an der Grenze zum En Streifen stimmt mit dem zuerst von Hans Meinhard (1983) theoretisch ausgearbeiteten Modell überein, das besagt, dass die Grenzen von Kompartimenten wichtige Referenzpunkte für Positionsinformationen darstellen, an denen Morphogene synthetisiert werden, in diesem Falle das Genprodukt *Dll* (Abb. 32B)

Das in dieser Arbeit analysierte Expressionsmuster von *Dll* und *en* bei *Porcellio scaber* zeigt einen mit der Regulation von *Dll* bei *Drosophila* übereinstimmenden zeitlichen Verlauf (Abb. 32C): Erst wenn alle Zellen der Reihe a innerhalb eines Segmentes *en* exprimieren, beginnt die Expression von *Dll* in der an diesen Streifen angrenzenden Zelle d₃. Überträgt man die Ergebnisse der Untersuchungen an *Drosophila* auf *Porcellio scaber*, würde man die Expression des Gens *ng* in der Zellreihe d vermuten, die anterior an die *en* positive Zellreihe a angrenzt. Bisher untersuchte Arthropoden zeigen ein konsistentes Expressionsmuster von *ng*, wie die Insekten *Gryllus*, *Schistocerca* und *Tribolium* (Nagy und Carroll 1994; Jockusch et al. 2000; Niwa et al. 2000), die Spinne *Cupiennius* (Schoppmeier und Damen 2001) und der Krebs *Triops* (Nulsen und Nagy 1999).

Bei *Orchestia cavimana* hingegen beginnt die *Dll* Expression zwar in der gleichen Zelle d₃, aber viel früher zu einem Zeitpunkt, an dem noch kein *en* in einer der angrenzenden Zellen exprimiert wird (Abb. 32C). Wg, der Aktivator von *Dll* bei anderen bisher untersuchten Arthropoden, dürfte hier, postuliert man die Aktivierung von *ng* durch En, noch gar nicht vorhanden sein. Das an *Drosophila* entwickelte Modell der *Dll* Regulation trifft auf *Orchestia cavimana* nicht zu.

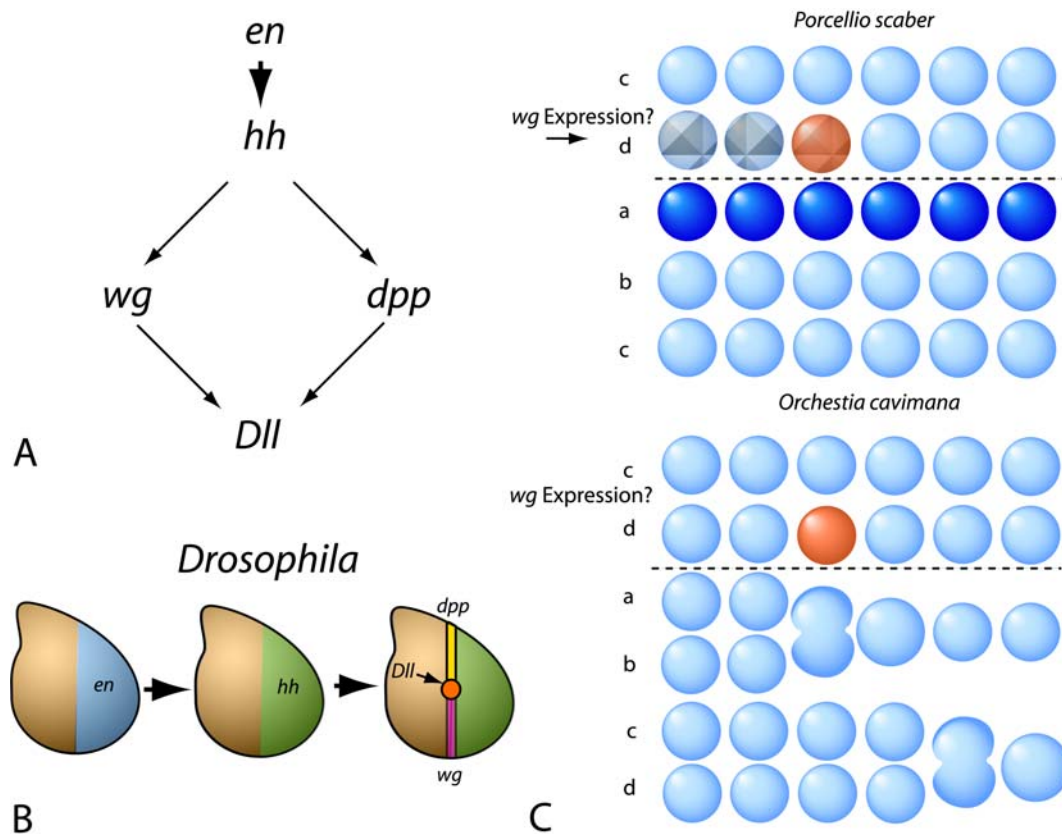


Abb. 32: **Unterschiede der *Dll* Expression bei *Porcellio scaber*, *Orchestia cavimana* im Vergleich zu *Drosophila melanogaster*.** (A) Regulationskaskade von *Dll* bei *Drosophila melanogaster* (vereinfacht nach Wolpert (2002)). *En* steuert über *Hh* die Expression von *wg* und *dpp*. Beide Genprodukte verursachen die Expression von *Dll*. (B) Expression der Regulationsgene von *Dll* in der Imaginalscheibe des Beins von *Drosophila* (nach Wolpert (2002)). In der posterioren Hälfte wird *en* exprimiert, dieses steuert die Expression von *hh*. An der Grenze der *en* Expression wird *wg* exprimiert, welches mit *Dpp* *Dll* aktiviert. (C) Vergleich des Beginns der *Dll* Expression in den Segmenten von *Porcellio scaber* und *Orchestia cavimana*. In *Porcellio scaber* beginnt die *Dll* Expression (braun) wie bei *Drosophila* an der Grenze zur *en* Expression (blau). Bei *Porcellio scaber* würde man die *wg* Expression (schraffierte Zellen) in den drei Zellen an der Grenze zur *en* Expression vermuten. Bei *Orchestia cavimana* beginnt die *Dll* Expression in der Zelle d₃, obwohl in keiner Zelle *en* Exprimiert wird. Die posterior gelegene Zelle, die später *en* exprimieren wird ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht gebildet.

Bei *Orchestia cavimana* ist *En* offensichtlich kein Schlüsselregulator für *Dll*, wie es bei *Drosophila* der Fall ist. Ein anderes Regulationssystem muss demzufolge bei *Orchestia cavimana* vorliegen. Einerseits ist vorstellbar, dass in *Orchestia cavimana* ein anderes Genprodukt die Funktion von *Wg* als Regulator für *Dll* übernimmt. Eine andere Möglichkeit wäre, dass sich die Expression von *wg* in Zellen der Reihe d ohne die bestehende *en* Expression etabliert. Letzteres ist nicht so unwahrscheinlich, da kürzlich gezeigt wurde, dass in der Heuschrecke *Schistocerca* sich *Wg* Streifen etablieren können lange bevor eine *en* Expression in diesem Bereich nachweisbar ist (Dearden und Akam 2001). Später bildet sich bei *Schistocerca* der *En* Streifen direkt am *wg* Streifen (Dearden und Akam 2001). Eine Etablierung eines *Wg* Streifens in Zellreihe d in *Orchestia cavimana* scheint also möglich. Eine Aktivierung des Gens *Dll*

ohne Wg wurde bisher in keinem Organismus nachgewiesen. Weitergehende Untersuchungen bezüglich der *wg* Expression und vor allem der Lokalisierung des sekretierten Proteins Wg in *Orchestia cavimana* würden zur Lösung des Problems beitragen.

4.11 Regulation der Zellteilungen bei *Porcellio scaber*: Zellteilungszyklen und Abhängigkeiten

Während der Embryonalentwicklung spielt die geordnete Teilung von Zellen eine elementare Rolle. Die Kontrolle der Zellteilungsrichtung, des Größenverhältnisses der Tochterzellen, sowie des Teilungszeitpunktes muss gewährleistet sein.

Der Zeitpunkt der Teilung wird durch den Zellzyklus einer Zelle reguliert. Der Kontrollmechanismus des Zellzyklus besteht aus einem zirkulären Auf- und Abbau von Proteinen, die die Prozesse wie DNA-Replikation, Chromatinkondensation, Kernhüllenabbau und Spindelaufbau steuern. Innerhalb eines Zellzyklus sind an definierten Stellen Kontrollpunkte (engl. Checkpoints) eingerichtet, an denen Informationen sowohl aus dem Inneren der Zelle, als auch aus der Umgebung eingeholt werden (Hartwell und Weinert 1989). Sind die Informationen negativ, wie z.B. nicht replizierte DNA oder eine fehlende Nachbarzelle, wird der Zellzyklus angehalten und die Zelle „wartet“, bis positive Informationen eingehen. Dabei ist es von Zelltyp, Zeitpunkt und Lage abhängig, welche Informationen abgerufen werden.

Durch die Anwendung der 4D-Mikroskopie konnte zum ersten Mal im Keimstreif eines Krebses die Zellzyklusdauer verschiedener Zelltypen festgestellt werden. Kombiniert mit den Ergebnissen aus gezielten Ablationen von Zellen können Aussagen über Abhängigkeiten zwischen unterschiedlichen Zellen festgestellt werden.

Bei *Porcellio scaber* findet man im Stadium der Gastrulation synchrone Teilungswellen der Zellen der Keimscheibe. Der Zellzyklus dieser Zellen ist mit der Dauer von 24 h im Vergleich zur Dauer der frühen Zellzyklen in den Embryonen von *Drosophila* (Dauer 8 min), *Caenorhabditis elegans* (15 min) und dem Zebrafisch *Danio rerio* (10 min) sehr lang. Bei *Porcellio scaber* zeigt sich der Trend der Verkürzung des Zellzyklus im Laufe der Entwicklung. In den Aufnahmen ist die M-Phase, vom Zeitpunkt der Anhebung aus dem Zellverband bis zur Cytokinese, in allen Zellen

ungefähr gleich lang. Die Dauer des Zellzyklus wird demzufolge durch die Verlängerung bzw. Verkürzung der Interphase bestimmt.

Nach der Ausdifferenzierung der ET aus den Zellen der Keimscheibe ist ihr Zellzyklus nur noch ungefähr 10 h lang, der der anterior gelegenen Zellen beträgt 12 bis 13 h. Während der Abgabe der ET-Derivate verkürzt sich der Zellzyklus der ET auf 6,5 h. Die Zellen der Reihen vor den ET-Derivaten teilen sich bei *Porcellio scaber* nicht in einer von innen nach aussen ablaufenden Welle, wie es bei *Leptochelia* der Fall ist (Dohle 1972). Die Analyse der 4D-Aufnahmen hat ergeben, dass die Zellteilungen in diesen Reihen bei *Porcellio scaber* mit der Teilungsreihenfolge der Mutterzellen weitgehend übereinstimmt. Die Reihenfolge der Zellteilungen wird durch den inneren Zyklus der Zellen reguliert, der von keinem übergeordneten Faktor zur Ausbildung einer Teilungswelle gesteuert wird. Auch die darauf folgenden Teilungen verlaufen bis zu den differentiellen Teilungen in keiner gerichteten Teilungswelle.

Die Ablationsexperimente der ET während der Bildung des Keimstreifens zeigen deutlich, dass zu diesem Stadium sich die beiden Körperhälften unabhängig voneinander entwickeln (Abb. 33). Eine gegenseitige Kontrolle der Körperhälften über das Entwicklungsstadium kann durch die Ergebnisse der Experimente ausgeschlossen werden. Die bisher im Keimstreif der Peracariden beobachtete Variabilität des Entwicklungsfortschritts beider Körperhälften (Dohle 1970, 1972; Hahnenkamp 1974; Dohle 1976a; Scholtz 1984; Scholtz 1990; Vehling 1994), kann durch deren Unabhängigkeit erklärt werden.

Dennoch existiert eine Teilungsabhängigkeit der anterioren Reihen von den posterioren. In der Keimstreifhälfte in der durch die Zellablation der hintere Teil nicht gebildet wurde, fanden in den vorderen Reihen des postnauplialen Bereichs keine differentiellen Teilungen statt. Der naupliale Bereich scheint sich aber dennoch normal weiterentwickelt zu haben.

Das Ausbleiben der differentiellen Teilungen in diesen vorderen Reihen deutet an, dass zum Stadium der differentiellen Teilungen der Zellzyklus stärker kontrolliert wird. Die Ablation der Zelle d₃ zeigt, dass bei den differentiellen Teilungen die Zellen überprüfen, ob Zellen, die sich normalerweise vorher teilen, ihre Teilung vollzogen haben. Die differentiellen Teilungen verliefen bis zu dem Zeitpunkt, an dem sich die ablatierte Zelle d₃ teilen würde, normal. Danach war die Entwicklung zunächst verzögert und nachfolgende Zellen traten in die M-Phase des Zellzyklus ein. Die Zellen stoppten ihren Teilungsprozess zum Zeitpunkt der Ausbildung der Metaphaseplatte und die Spindel blieb in der Ausrichtung der folgenden Teilung

positioniert. In den Zellen scheint im Zellzyklus ein Checkpoint zu Beginn der Anaphase vorzuliegen, an dem überprüft wird, ob sich die anderen Zellen bereits geteilt haben. Ist dies nicht der Fall, wird der Zellzyklus angehalten.

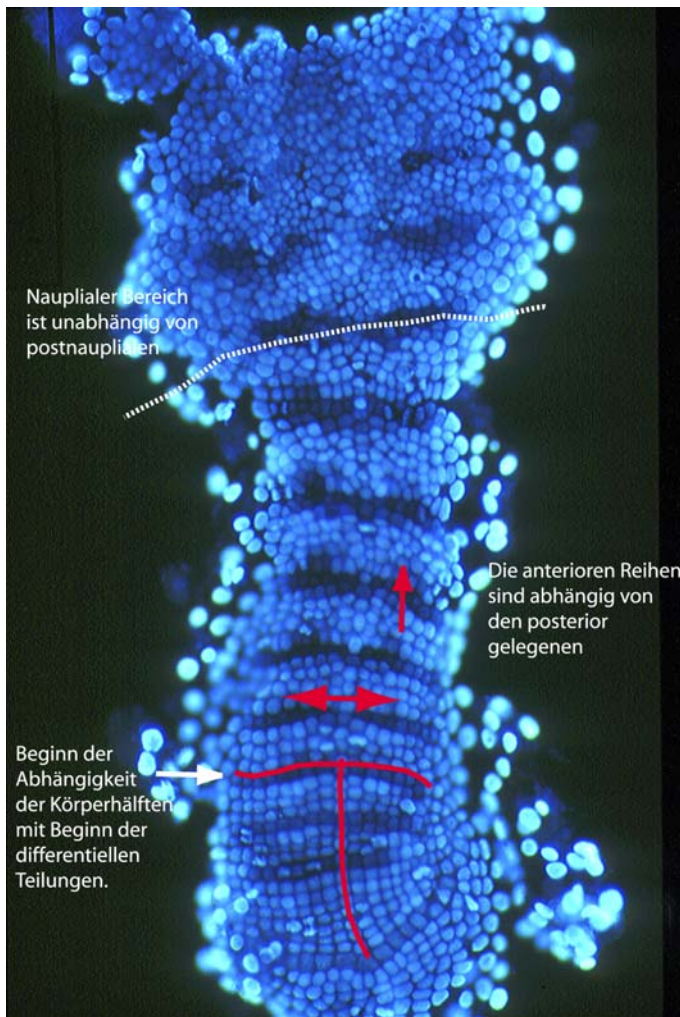


Abb. 33: Zusammenfassendes Modell der Ablationsexperimente.

Unregelmässigkeiten in der Teilungsreihenfolge während der differentiellen Teilungen, z.B. die mögliche Teilung der Zelle b_2 vor der Zelle b_1 , zeigen, dass nicht jede Zellteilung überprüft wird, sondern nur die von einigen Zellen. Welche dies sind, ließe sich durch Ablationen anderer Zellen herausfinden.

Die Überprüfung der Zellteilungen findet nicht nur in der eigenen Körperhälfte statt, sondern betrifft auch Zellen der Mittellinie und der anderen Körperhälfte. Zellen der Mittellinie und nach fortschreitender Entwicklung auch Zellen der anderen Körperhälfte stoppten ihren Teilungsprozess in der Metaphase

Die Keimstreifhälften sind demzufolge in den Teilungen der ET und ihrer Derivate bis zu Beginn der differentiellen Teilungen voneinander unabhängig. Mit der Differenzierung der Segmente wird die Entwicklung einer Körperhälfte von der anderen abhängig. Die Ergebnisse der Experimente sind in Abb. 33

zusammengefasst. Aus den Ergebnissen der durchgeführten Experimente ist auszuschließen, dass im postnauplialen Keimstreif Zellen das Schicksal ihrer Nachbarzelle einnehmen können, wie es z.B. für die Entwicklung des Nematoden *Caenorhabditis elegans* gezeigt werden konnte (Sulston et al. 1983).

Die Ergebnisse der Ektoteloblastenablation ähneln denen, der experimentellen Untersuchungen von Bock (1942) an der Florfliege *Chrysopa*. Durch Brennung wurde auf einer Körperhälfte das Ektoderm ausgeschaltet. Das Mesoderm breitete sich weiter aus, differenzierte sich jedoch nicht aus, sondern degenerierte. Das Ektoderm der intakt gelassenen Körperhälfte differenzierte sich ebenfalls nicht vollständig und stoppte mit der Entwicklung (Bock 1942). Vergleicht man Bocks Ergebnisse mit den hier durchgeführten Ablationen der ET, entsprechen die undifferenzierten Zellen in der ablatierten Körperhälfte den Mesodermzellen. Bei der Florfliege sind ebenfalls für die Ausdifferenzierung des Ektoderms beide Körperhälften notwendig und voneinander abhängig.

Diese Ergebnisse lassen sich jedoch nicht auf alle Arthropoden übertragen, da bei den Insekten das Regenerationsvermögen unterschiedlich stark ausgebildet ist. Die Experimente von Krause (1934) an der Gewächshausschrecke *Tachycines* zeigen, dass nach einer Spaltsetzung in der Keimanlage im posterioren Bereich der Embryo in der weiteren Entwicklung das Hinterende verdoppelt. Eine Körperhälfte kann also die andere regenerieren.

Trotz der konvergenten Entstehung der Teloblasten bei Egel (Dohle 1972), sollen Ergebnisse von Ablationsexperimenten mit den vorliegenden verglichen werden (Blair und Weisblat 1984). Ablatiert man einen Teloblasten bei *Helobdella*, breiten sich die Abkömmlinge der Nachbarteloblasten auf den fehlenden Bereich aus (Blair und Weisblat 1984). Dabei können die Abkömmlinge auch die ventrale Mittellinie kreuzen. Die ET-Derivate bei *Porcellio scaber* zeigen keine Tendenz, sich auf den fehlenden Bereich auszubreiten.

Literaturverzeichnis

- Abzhanov, A und T C Kaufman (2000). Evolution of distinct expression patterns for *engrailed* paralogues in higher crustaceans (Malacostraca). *Dev Genes Evol* **210**(10): 493-506.
- Basler, K und G Struhl (1994). Compartment boundaries and the control of *Drosophila* limb pattern by hedgehog protein. *Nature* **368**(6468): 208-214.
- Blair, S S und D A Weisblat (1984). Cell interactions in the developing epidermis of the leech *Helobdella triserialis*. *Dev Biol* **101**(2): 318-325.
- Bock, E (1942). Wechselbeziehungen zwischen den Keimblättern bei der Organbildung von *Chrysopa perla* (L.). I. Die Entwicklung des Ektoderms in mesodermdefekten Keimteilen. *Entw mech Org Arch* **141**: 159-247.
- Bossinger, O und E Schierenberg (1996). Early embryonic induction in *C. elegans* can be inhibited with polysulfated hydrocarbon dyes. *Dev Biol* **176**(1): 17-21.
- Bowerman, B (1995). Determinants of blastomere identity in the early *C. elegans* embryo. *Bioessays* **17**(5): 405-414.
- Calman, W T (1904). On the classification of the Crustacea Malacostraca. *Ann Mag Nat Hist* **13**: 144-158.
- Cohen, B, A A Simcox und S M Cohen (1993). Allocation of the thoracic imaginal primordia in the *Drosophila* embryo. *Development* **117**(2): 597-608.
- Cohen, S M (1990). Specification of limb development in the *Drosophila* embryo by positional cues from segmentation genes. *Nature* **343**(6254): 173-177.
- Cohen, S M, G Brönner, F Küttner, G Jürgens und H Jäckle (1989). *Distal-less* encodes a homoeodomain protein required for limb development in *Drosophila*. *Nature* **338**(6214): 432-434.
- Coleman, K G, S J Poole, M P Weir, W C Soeller und T Kornberg (1987). The *invected* gene of *Drosophila*: sequence analysis and expression studies reveal a close kinship to the *engrailed* gene. *Genes Dev* **1**(1): 19-28.
- Dahmann, C und K Basler (1999). Compartment boundaries: at the edge of development. *Trends Genet* **15**(8): 320-326.
- Damen, W G, M Weller und D Tautz (2000). Expression patterns of hairy, even-skipped, and runt in the spider *Cupiennius salei* imply that these genes were segmentation genes in a basal arthropod. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(9): 4515-4519.

- Dearden, P K und M Akam (2001). Early embryo patterning in the grasshopper, *Schistocerca gregaria*: *wingless*, *decapentaplegic* and *caudal* expression. *Development* **128**(18): 3435-3444.
- Diaz-Benjumea, F J, B Cohen und S M Cohen (1994). Cell interaction between compartments establishes the proximal-distal axis of *Drosophila* legs. *Nature* **372**(6502): 175-179.
- Dohle, W (1970). Die Bildung und Differenzierung des postnauplialen Keimstreifs von *Diastylis rathkei* (Crustacea, Cumacea) I. Die Bildung der Teloblasten und ihrer Derivate. *Z Morph Tiere* **67**: 307-392.
- Dohle, W (1972). Über die Bildung und Differenzierung des postnauplialen Keimstreifs von *Leptochelia spec.* (Crustacea, Tanaidacea). *Zool Jb Anat* **89**: 503-566.
- Dohle, W (1976a). Die Bildung und Differenzierung des postnauplialen Keimstreifs von *Diastylis rathkei* (Crustacea, Cumacea). II. Die Differenzierung und Musterbildung des Ektoderms. *Zoomorphologie* **84**: 235-277.
- Dohle, W (1976b). Zur Frage des Nachweises von Homologien durch die komplexen Zell- und Teilungsmuster in der embryonalen Entwicklung höherer Krebse (Crustacea, Malacostraca, Peracarida). *Sitzber Ges Naturf Freunde Berlin* **16**: 125-144.
- Dohle, W (1989). Zur Frage der Homologie ontogenetischer Muster. *Zool Beitr N F* **32**: 355-389.
- Dohle, W und G Scholtz (1988). Clonal analysis of the crustacean segment: the discordance between genealogical and segmental borders. *Development* **104 Suppl.**: 147-160.
- Dohle, W und G Scholtz (1995). Segmentbildung im Keimstreif der Krebse. *Biol in uns Zeit* **25**: 90-100.
- Dohle, W und G Scholtz (1997). How far does cell lineage influence cell fate specification in crustacean embryos? *Sem Cell Dev Biol* **8**: 379-390.
- Garcia-Bellido, A und P Santamaria (1972). Developmental analysis of the wing disc in the mutant *engrailed* of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **72**(1): 87-104.
- Gerberding, M und G Scholtz (1999). Cell lineage of the midline cells in the amphipod crustacean *Orchestia cavimana* (Crustacea, Malacostraca) during formation and separation of the germ band. *Dev Genes Evol* **209**(2): 91-102.
- Gibert, J M, E Mouchel-Vielh und J S Deutsch (1997). *engrailed* duplication events during the evolution of barnacles. *J Mol Evol* **44**(6): 585-594.

- Gonzalez-Crespo, S und G Morata (1996). Genetic evidence for the subdivision of the arthropod limb into coxopodite and telopodite. *Development* **122**(12): 3921-3928.
- Hahnenkamp, L (1974). Die Bildung und Differenzierung des Keimstreifens der Asseln (Isopoda) und anderer höherer Krebse. Eine vergleichend-embryologische Studie. Zulassungsarbeit für die erste (wissenschaftliche) Staatsprüfung, Berlin.
- Hartwell, L H und T A Weinert (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* **246**(4930): 629-634.
- Hui, C C, K Matsuno, K Ueno und Y Suzuki (1992). Molecular characterization and silk gland expression of *Bombyx engrailed* and *invected* genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**(1): 167-171.
- Jockusch, E L, C Nulsen, S J Newfeld und L M Nagy (2000). Leg development in flies versus grasshoppers: differences in *dpp* expression do not lead to differences in the expression of downstream components of the leg patterning pathway. *Development* **127**(8): 1617-1626.
- Krause, G (1934). Analyse erster Differenzierungsprozesse im Keim der Gewächshausschrecke durch künstlich erzeugte Zwillingsdoppel und Mehrfachbildungen. *Arch Entwickl Mechan* **132**: 115-205.
- Manzanares, M, R Marco und R Garesse (1993). Genomic organization and developmental pattern of expression of the *engrailed* gene from the brine shrimp *Artemia*. *Development* **118**(4): 1209-1219.
- McMurrich, J P (1895). Embryology of the isopod Crustacea. *J Morph* **11**(63-154).
- Meinhardt, H (1983). Cell determination boundaries as organizing regions for secondary embryonic fields. *Dev Biol* **96**(2): 375-385.
- Mittmann, B und G Scholtz (2001). *Distal-less* expression in embryos of *Limulus polyphemus* (Chelicerata, Xiphosura) and *Lepisma saccharina* (Insecta, Zygentoma) suggests a role in the development of mechanoreceptors, chemoreceptors, and the CNS. *Dev Genes Evol* **211**(5): 232-243.
- Morata, G und P A Lawrence (1975). Control of compartment development by the *engrailed* gene in *Drosophila*. *Nature* **255**(5510): 614-617.
- Nagy, L M und S Carroll (1994). Conservation of wingless patterning functions in the short-germ embryos of *Tribolium castaneum*. *Nature* **367**(6462): 460-463.
- Niwa, N, Y Inoue, A Nozawa, M Saito, Y Misumi, H Ohuchi, H Yoshioka und S Noji (2000). Correlation of diversity of leg morphology in *Gryllus bimaculatus*

- (cricket) with divergence in *dpp* expression pattern during leg development. *Development* **127**(20): 4373-4381.
- Nulsen, C und L M Nagy (1999). The role of wingless in the development of multibranching crustacean limbs. *Dev Genes Evol* **209**(6): 340-348.
- Olesen, J, S Richter und G Scholtz (2001). The evolutionary transformation of phyllopodous to stenopodous limbs in the Branchiopoda (Crustacea) - Is there a common mechanism for early limb development in arthropods? *Int J Dev Biol* **45**: 869-876.
- Panganiban, G, S M Irvine, C Lowe, H Roehl, L S Corley, B Sherbon, J K Grenier, J F Fallon, J Kimble, M Walker, G A Wray, B J Swalla, M Q Martindale und S B Carroll (1997). The origin and evolution of animal appendages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(10): 5162-5166.
- Panganiban, G, A Sebring, L Nagy und S Carroll (1995). The development of crustacean limbs and the evolution of arthropods. *Science* **270**(5240): 1363-1366.
- Patel, N H (1994). Imaging neuronal subsets and other cell types in whole mount *Drosophila* embryos and larvae using antibody probes. *Methods in cell biology. Vol. 44 Drosophila melanogaster: Practical Uses in Cell Biology*. L S B Goldstein und E Fyrberg. New York, Academic Press.
- Patel, N H, T B Kornberg und C S Goodman (1989a). Expression of *engrailed* during segmentation in grasshopper and crayfish. *Development* **107**(2): 201-212.
- Patel, N H, E Martin-Blanco, K G Coleman, S J Poole, M C Ellis, T B Kornberg und C S Goodman (1989b). Expression of engrailed proteins in arthropods, annelids, and chordates. *Cell* **58**(5): 955-968.
- Peterson, M D, A Popadic und T C Kaufman (1998). The expression of two *engrailed*-related genes in an apterygote insect and a phylogenetic analysis of insect *engrailed*-related genes. *Dev Genes Evol* **208**(10): 547-557.
- Popadic, A, G Panganiban, D Rusch, W A Shear und T C Kaufman (1998). Molecular evidence for the gnathobasic derivation of arthropod mandibles and for the appendicular origin of the labrum and other structures. *Dev Genes Evol* **208**(3): 142-150.
- Queinnec, E, E Mouchel-Vielh, M Guimonneau, J M Gibert, Y Turquier und J S Deutsch (1999). Cloning and expression of the *engrailed.a* gene of the barnacle *Sacculina carcini*. *Dev Genes Evol* **209**(3): 180-185.
- Richter, S und G Scholtz (2001). Phylogenetic analysis of the Malacostraca (Crustacea). *J Zool Syst Evol Res* **39**(3): 113-136.

- Schnabel, R, H Hutter, D Moerman und H Schnabel (1997). Assessing normal embryogenesis in *Caenorhabditis elegans* using a 4D microscope: variability of development and regional specification. *Dev Biol* **184**(2): 234-265.
- Scholtz, G (1984). Untersuchungen zur Bildung und Differenzierung des postnauplialen Keimstreifs von *Neomysis integer* LEACH (Crustacea, Malacostraca, Peracarida). *Zool Jb Anat* **112**: 295-349.
- Scholtz, G (1990). The formation, differentiation and segmentation of the post-naupliar germ band of the amphipod *Gammarus pulex* L. (Crustacea, Malacostraca, Peracarida). *Proc R Soc Lond B* **239**: 163-211.
- Scholtz, G (1992). Cell lineage studies in the crayfish *Cherax destructor* (Crustacea, Decapoda): germ band formation, segmentation, and early neurogenesis. *Roux's Arch Dev Biol* **202**: 36-48.
- Scholtz, G (1995a). Expression of the *engrailed* gene reveals nine putative segment-anlagen in the embryonic pleon of the freshwater crayfish *Cherax destructor*. *Biol Bull* **188**: 157-165.
- Scholtz, G (1995b). Head segmentation in Crustacea - an immunocytochemical study. *Zoology* **98**: 104-114.
- Scholtz, G und W Dohle (1996). Cell lineage and cell fate in crustacean embryos--a comparative approach. *Int J Dev Biol* **40**(1): 211-220.
- Scholtz, G, W Dohle, R E Sandeman und S Richter (1993). Expression of *engrailed* can be lost and regained in cells of one clone in crustacean embryos. *Int J Dev Biol* **37**(2): 299-304.
- Scholtz, G, B Mittmann und M Gerberding (1998). The pattern of *Distal-less* expression in the mouthparts of crustaceans, myriapods and insects: new evidence for a gnathobasic mandible and the common origin of Mandibulata. *Int J Dev Biol* **42**(6): 801-810.
- Scholtz, G, N H Patel und W Dohle (1994). Serially homologous *engrailed* stripes are generated via different cell lineages in the germ band of amphipod crustaceans (Malacostraca, Peracarida). *Int J Dev Biol* **38**(3): 471-478.
- Schoppmeier, M und W G Damen (2001). Double-stranded RNA interference in the spider *Cupiennius salei*: the role of *Distal-less* is evolutionarily conserved in arthropod appendage formation. *Dev Genes Evol* **211**(2): 76-82.
- Schram, F R und S Koenemann (2001). Developmental genetics and arthropod evolution: part 1, on legs. *Evol Dev* **3**(5): 343-354.

- Seaver, E C, D A Paulson, S Q Irvine und M Q Martindale (2001). The spatial and temporal expression of *Cb-en*, the *engrailed* gene in the polychaete *Chaetopterus*, does not support a role in body axis segmentation. *Dev Biol* **236**(1): 195-209.
- Shain, D H, D K Stuart, F Z Huang und D A Weisblat (2000). Segmentation of the central nervous system in leech. *Development* **127**(4): 735-744.
- Sieg, J (1984). Neuere Erkenntnisse zum natürlichen System der Tanaidacea. *Zoologica (Stuttgart)* **136**: 1-132.
- Siewing, R (1951). Besteht eine engere Verwandtschaft zwischen Isopoden und Amphipoden? *Zool Anz* **147**: 166-180.
- Sulston, J E, E Schierenberg, J G White und J N Thomson (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **100**(1): 64-119.
- Telford, M J und R H Thomas (1998). Expression of homeobox genes shows chelicerate arthropods retain their deutocerebral segment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(18): 10671-10675.
- Vehling, D (1994). Die Entwicklung des postnaulialen Keimstreifs von *Porcellio scaber*. Eine zellgenealogische Studie. Diplomarbeit, Freie Universität Berlin.
- Vincent, J P und P A Lawrence (1994). *Drosophila* wingless sustains *engrailed* expression only in adjoining cells: evidence from mosaic embryos. *Cell* **77**(6): 909-915.
- Vincent, J P und P H O'Farrell (1992). The state of *engrailed* expression is not clonally transmitted during early *Drosophila* development. *Cell* **68**(5): 923-931.
- Wedeer, C J, R G Kostriken, D Leach und P Whittington (1997). Segmentally iterated expression of an *engrailed*-class gene in the embryo of an Australian onychophoran. *Dev Genes Evol* **207**: 282-286.
- Williams, T A (1998). *Distalless* expression in crustaceans and the patterning of branched limbs. *Dev Genes Evol* **207**(7): 427-434.
- Williams, T A, C Nulsen und L M Nagy (2001). A complex role for *Distal-less* in crustacean appendage development. *Dev Biol* **241**: 302-312.
- Wolpert, L (2002). *Principles of development* 2nd ed. New York, Oxford University Press.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zelllinie, Zelldifferenzierung und das Expressionsmuster der Gene *engrailed* und *Distalless* im postnauplialen Keimstreif der Höheren Krebse *Porcellio scaber* und *Orchestia cavimana* untersucht. Bei dem Isopoden *Porcellio scaber* wird ein Großteil des Ektoderms des postnauplialen Keimstreifs durch Ektoteloblasten gebildet, die nach anterior Reihen von Zellen abgeben. Im Keimstreif des Amphipoden *Orchestia cavimana* entstehen die Reihen durch Anordnung von Zellen. Bei beiden Arten bilden diese Ektodermzellen ein Gittermuster, welches die genaue Identifizierung der Zellen ermöglicht und dadurch Genexpressionsmuster mit einer zellulären Auflösung analysiert werden können.

Mit einem 4D-Mikroskop, welches 3D-Aufnahmen eines Embryos in definierten zeitlichen Abständen aufzeichnet, wurde erstmalig die Zelllinie im Keimstreif an einem lebenden Malakostraken beobachtet. Dadurch ließen sich neben der Erfassung der genauen Zelllinie auch Zellverschiebungen und Zellimmigrationen beobachten. Mit dieser Methode konnte erstmals die Dauer des Zellzyklus verschiedener Zelltypen bestimmt werden. Mit immunhistochemischen Färbungen der Genprodukte *Engrailed* und *Distal-less* in Keimstreifpräparaten wurde das Expressionsmuster der beiden Gene mit zellulärer Auflösung verfolgt. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen ergänzen die Bilder der Morphogenese aus der 4D-Mikroskopie. Gezielte Zellablationen im Keimstreif von *Porcellio scaber* mit Hilfe eines Lasers ermöglichten es, Aussagen über Abhängigkeiten der Zellteilungen im Keimstreif zu treffen.

- Die Beschreibung der Zelllinie im Keimstreif von Isopoden wurde an der Kellerrassel *Porcellio scaber* durchgeführt. Die Untersuchung fügt sich in bereits durchgeführte Beschreibungen der Zelllinie anderer Peracarida ein. Dabei zeigte sich, dass die Zellreihen **E(2)** und **E(3)** aus der Teilung der Reihe **B** entstehen, wie dies auch bei den Tanaidacea der Fall ist. Dieses Ergebnis unterstützt ein Schwestergruppenverhältnis von Isopoda und Tanaidacea. Die 4D-Aufnahmen zeigen eine Zellsortierung im Bereich der Reihen **E(0)** und **E(1)**, die in anderen Peracarida so nicht beobachtet wurde.

- Das Expressionsmuster des Segmentierungsgens *engrailed* in den lateralen Ektodermzellen wurde mit zellgenauer Auflösung an einem Vertreter der Isopoda beschrieben. *Porcellio scaber* zeigt im Keimstreif ein invariantes Expressionsmuster wie es in anderen Peracarida zu finden ist. Ähnlichkeiten mit dem Expressionsmuster von Mysidaceen bestehen z.B. in dem frühen Beginn der *engrailed* Expression innerhalb einer genealogischen Einheit vor Teilung der Reihe **ab**. Abweichend zu anderen Malakostraken ist z.B. die Expression in den Zellen Reihe **E(1)** bei *Porcellio scaber* anfangs sehr variant, wird später jedoch invariant.
- Das Expressionsmuster von *Distal-less*, welches eine wichtige Rolle bei der Beinentwicklung spielt, wurde im postnauplialen Keimstreif eines Amphipoden und eines Isopoden mit zellgenauer Auflösung beschrieben. Beide Arten zeigen ein konserviertes Expressionsmuster, welches jedoch eine zeitliche Verschiebung im Entwicklungsverlauf zeigt (Heterochronie). Das Muster der *Distal-less* Expression bei *Orchestia cavimana* ist zeitlich zu dem Muster von *engrailed* so stark verschoben, dass die Regulationskaskade über *engrailed* und *wingless* wie sie in *Drosophila* vorhanden ist, hier nicht existent sein kann.
- Die *Distal-less* Expression spiegelt in beiden Arten die Morphogenese der Beine wider. In der breiten Beinknospe von *Orchestia cavimana* findet man ein breites Feld *Distal-less* exprimierender Zellen; in der schmalen Beinknospe von *Porcellio scaber* ist die Expression auf ein kleines Feld von Zellen beschränkt.
- Das Expressionsmuster des Gens *Distal-less* entspricht seiner postulierten Funktion bei der proximodistalen Achsendetermination von Extremitäten. In den einästigen Thorakopoden beider Arten verschwindet die *Distal-less* Expression in den lateralen Zellen (*Orchestia cavimana*), oder wird in diesen erst gar nicht exprimiert (*Porcellio scaber*). In den zweiästigen Pleopoden exprimieren die lateralen Zellen *Distal-less* und wachsen zu den Exopoditen aus.
- Durch die Ablation der Ektoteloblasten einer Körperhälfte konnte gezeigt werden, dass sich eine Keimstreifhälfte ohne die andere bilden kann. Durch die Ablation der Zelle d₃ konnte gezeigt werden, dass sich später, zum Zeitpunkt der differentiellen Teilungen, eine Abhängigkeit zwischen den Zellteilungen beider Körperhälften, sowie zwischen den Zellen einer genealogischen Einheit etabliert hat. Die Teilungsabhängigkeiten werden über einen Kontrollpunkt während der Metaphase reguliert.

6 Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Gerhard Scholtz für die gute Betreuung und für die anregenden und inspirierenden Diskussionen. Des Weiteren bin ich dankbar für die Vermittlung der Prinzipien der phylogenetischen Systematik und für die Freiheit, die mir bei der Gestaltung der Lehre gegeben wurde.

Allen der Arbeitsgruppe Vergleichende Zoologie der Humboldt-Universität zu Berlin danke ich für die Diskussionen und die Unterstützung.

Prof. Dr. Ralf Schnabel von der Technischen Universität Braunschweig danke ich für die engagierte Einführung in die 4D-Mikroskopie und Zellablation und für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe die Aufnahmen und Experimente durchzuführen.

Allen der Arbeitsgruppe Entwicklungsgenetik der Technischen Universität Braunschweig danke ich für die herzliche Aufnahme. Der Wohngemeinschaft Katreppeln danke ich für die Unterkunftsmöglichkeit in Braunschweig und für die abendlichen Diskussionen.

Dr. Nipam Patel, Prof. Dr. Harald Saumweber, Dr. Grace Panganiban und Dr. Rob White danke ich für die Überlassung von Antikörpern; Dr. Siegfried Rogaschewski und Renate Predhumeau danke ich für die Hilfe bei der Elektronenmikroskopie.

Schliesslich danke ich meinen Eltern ohne deren Hilfe die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Lebenslauf

11. 10. 1969	Geburt in Bremen
1976 – 1989	Grundschule und Gymnasium in Bremen mit Abschluß (Abitur)
1989 – 1990	Zivildienst bei der Spastikerhilfe Bremen e.V.
WS 1990/91	Studium der Chemie an der Universität Bremen
1991 – 1996	Studium der Biologie an der Freien Universität Berlin
10/1994 – 06/1995	ERASMUS-Stipendiat am Fachbereich Biologie der Universität de Valencia, Spanien
11/1995 – 12/1996	Prüfungen und Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Titel „Cytokinese und Pollappenbildung – Zu den unterschiedlichen Funktionen des Cytoskeletts während der ersten Furchungsteilung von <i>Ilyanassa obsoleta</i> “ bei Prof. Dr. Hans-Dieter Pfannenstiel, Arbeitsgruppe Entwicklungsphysiologie der Freien Universität zu Berlin. Ausgezeichnet mit dem Katharina-Heinroth-Preis 1998
11/1995 – 12/1996	Forschungsaufenthalt im Rahmen der Diplomarbeit an der Universiteit Utrecht, Niederland in der Arbeitsgruppe von Prof J.A.M van den Biggelaar
01/1996 – 09/1997	Werksstudent bei der Firma TELES AG, Berlin im Bereich der Rechnerkonfiguration
10/1997 – 01/2002	Arbeit am Promotionsvorhaben „Der postnaupliale Keimstreif von <i>Porcellio scaber</i> und <i>Orchestia cavimana</i> (Crustacea, Peracarida): Zelllinie, Genexpression und Beginn der Morphogenese“ bei Prof. Dr. Gerhard Scholtz, Arbeitsgruppe Vergleichende Zoologie der Humboldt-Universität zu Berlin
10/1997 – 02/1998	Lehrauftrag am Institut für Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin für die „Übungen zur Morphologie, Phylogenie und Systematik der Tiere“
02/1998 – 02/2001	Wissenschaftlicher Mitarbeiter mit Lehrtätigkeit in der Arbeitsgruppe Vergleichende Zoologie bei Prof. Dr. Gerhard Scholtz. Lehre: Grundpraktikum Zoologie, Seminare zu Evolution und phylogenetischer Systematik, sowie im Fachbereich Gender Studies.
03/2001 – 01/2001	Wissenschaftlicher Mitarbeiter DFG-Schwerpunkt: „Evolution entwicklungsbiologischer Prozesse“.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel erarbeitet und verfasst habe.

Diese Arbeit wurde keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Berlin, im Februar 2002

Andreas Hejnl